

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III



**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE HEMICANALES Y SU
IMPLICACIÓN EN EL MECANISMO DE SECRECIÓN DE
INSULINA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Javier Pizarro Delgado

Bajo la dirección del doctor

Jorge Tamarit Rodríguez

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III



**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE HEMICANALES
Y SU IMPLICACIÓN
EN EL MECANISMO DE SECRECIÓN DE INSULINA**

TESIS DOCTORAL

JAVIER PIZARRO DELGADO

Madrid, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III



**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE HEMICANALES
Y SU IMPLICACIÓN
EN EL MECANISMO DE SECRECIÓN DE INSULINA**

MEMORIA PRESENTADA POR

JAVIER PIZARRO DELGADO

PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

BAJO LA DIRECCIÓN DEL

Dr. JORGE TAMARIT RODRÍGUEZ



D. JORGE TAMARIT RODRÍGUEZ, CATEDRÁTICO del DEPARTAMENTO de BIOQUÍMICA y BIOLOGÍA MOLECULAR III de la FACULTAD de MEDICINA de la UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICA:

Que el licenciado JAVIER PIZARRO DELGADO ha realizado el trabajo titulado **“CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE HEMICANALES Y SU IMPLICACIÓN EN EL MECANISMO DE SECRECIÓN DE INSULINA”**, bajo mi dirección, en el DEPARTAMENTO de BIOQUÍMICA y BIOLOGÍA MOLECULAR III de la FACULTAD de MEDICINA de la UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID para optar al grado de Doctor.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, expide el presente certificado en Madrid, a 13 de noviembre de 2012.

Vº Bº del Director

Fdo: Jorge Tamarit Rodríguez

...siempre he creído que las cosas no se dicen, sino que se demuestran. Por eso, en estas líneas quería expresaros mi gratitud por todo lo que me habéis demostrado durante todos estos años, durante este camino recorrido que acaba aquí, que significa el final de una etapa, pero que dará paso al comienzo de otra...

Al Dr. Jorge Tamarit Rodríguez. Desde el principio me he sentido apoyado tanto profesional como personalmente. Más que nada has sido un compañero en este viaje realizado. Nuestras largas horas al frente del microscopio han dado para muchas conversaciones, para contar multitud de anécdotas y para aprender muchas cosas. Por esa aventura americana que vivimos con tanta intensidad y que me sirvió para enriquecerme no sólo a nivel profesional sino también personal. Sólo puedo decirte, GRACIAS.

Al Dr. Rafael Martín Del Río, por su gran ayuda y por sus consejos que siempre sirvieron de orientación para el desarrollo de este trabajo. Al Dr. Luis Carlos Barrio Calvo por su aportación del modelo animal de ratones transgénicos que han servido para obtener parte de los resultados de este trabajo. A Jnés, porque los inicios siempre son difíciles y estuviste ahí para hacer que fueran más fáciles.

A todas las personas del Departamento de Bioquímica que de alguna u otra forma me ayudaron y me mostraron su cariño todo este tiempo. En especial a mi paisana Mari Ángeles por esos buenos momentos en el laboratorio y a Ana, por nuestras charlas tanto en la cercanía como en la distancia que me ayudaron a mantener siempre el optimismo.

A mi familia "Bostoniana" de la BU, al Dr. Jude Deeney, a Laura, Nathan, Thom, Sarah, Marc,... y en especial a la Dra. Barbara Corkey por acogerme en su laboratorio. No olvidaré nunca esos meses...

A todos los amigos que afortunadamente me he ido encontrando en las diversas etapas vividas...

De mi primera etapa universitaria, en la Facultad de Químicas de Ciudad-Real, a Chencho, Luis, Javi, Marta... y de mi segunda etapa en la Universidad Complutense de Madrid, a mis amigos Zamo y Lagares, por cada momento vivido que nunca olvidaré y a Noela, por ser especial... a los que quiero agradecer la amistad que me brindasteis desde el primer día y que, a pesar de la distancia, os sigo llevando en mi recuerdo.

A mis AMIGOS de siempre, a esa "Peña" que formamos en ese "nuestro" pueblo y que a pesar de los años pasados seguimos juntos. Cada uno con su vida, pero con el recuerdo y la seguridad de que cada instante vivido con vosotros es imborrable. A mi "Granao", "Tiago", "Cheri", Fran, "Ruper", "Jauma", "Cano", Rafa, "Pichi"... sólo puedo expresar la gran suerte que tuve al conocerlos y mi enorme agradecimiento por hacerme sentirme especial. Y como no a mi "Sape", simplemente por ser como eres... tu amistad es una de las mejores cosas que me han pasado. Sólo decirte que eres grande chaval!x

Aunque normalmente estas palabras van dirigidas a personas, también quería agradecer a mi pueblo todo lo que me ha aportado... ese rincón particular en el que me siento importante y en el que los recuerdos son como fuentes de energía que necesito para afrontar cada etapa...

Y por último, a mi familia...

A Casti, Antonio y Beatriz, por estar siempre ahí y porque ser vuestro hermano es el mejor tesoro que uno puede tener. A Mariví, por esa energía que nos contagia. A Alberto, porque, más que un "cuñado", eres un amigo para mí. A Valeria, mi "chiqui", porque tu sonrisa es la mayor fortuna que te pueden regalar...

A Carmen, porque a tu lado soy feliz. Sólo recuerda tres letras: "TSG" ...

A mis padres, por aportarme la educación, el respeto, la responsabilidad, y la humildad que hay que tener para ser una buena persona... No habría hojas suficientes para agradeceros todo lo que me habéis dado y además sé que no llegaríais al final... así que sólo puedo decir dos palabras: Os quiero!

ÍNDICE

ABREVIATURAS	17
---------------------------	----

RESUMEN	21
----------------------	----

INTRODUCCIÓN

1. DIABETES MELLITUS	25
-----------------------------------	----

1.1. DIABETES MELLITUS TIPO 1.....	27
------------------------------------	----

1.2. DIABETES MELLITUS TIPO 2.....	28
------------------------------------	----

2. ISLOTES DE LANGERHANS	30
---------------------------------------	----

3. CÉLULA β	31
---	----

3.1. Mecanismo de secreción de insulina. Acoplamiento estímulo-secreción	32
---	----

3.1.1. Metabolismo de la glucosa	33
--	----

3.1.2. Otros nutrientes secretagogos.....	34
---	----

3.1.3. Mecanismo de secreción dependiente de K_{ATP} (<i>fase de "iniciación"</i>)	35
--	----

3.1.4. Mecanismo de secreción independiente de K_{ATP} (<i>fase de "amplificación"</i>)	36
---	----

3.2. Regulación del mecanismo de secreción	38
---	----

3.3. Mecanismo de exocitosis de los gránulos de insulina	40
---	----

4. MECANISMOS DE COMUNICACIÓN INTERCELULAR	42
---	----

4.1. Conexinas, conexas ("hemicanales") y "gap junctions"	43
--	----

4.2. Comunicación intercelular en islotes pancreáticos	48
---	----

4.2.1. Conexina-36. Generalidades.....	48
--	----

4.2.2. Conexina-36 y su función en la célula β . Implicación en la secreción de insulina.....	49
---	----

4.2.3. Conexina-36. Patologías y perspectivas en la Diabetes Mellitus.....	52
--	----

OBJETIVOS	57
------------------------	----

MATERIALES Y MÉTODOS

1. AISLAMIENTO DE ISLOTES PANCREÁTICOS.....	61
2. SECRECIÓN DE INSULINA.....	61
2.1. Perifusión de islotes pancreáticos.....	61
2.2. Medida de la concentración de insulina.....	63
2.2.1. RADIOINMUNOENSAYO.....	63
1. Marcaje y purificación de insulina radioyodada con ¹²⁵ I-Insulina.....	63
2. Preparación de anticuerpo frente a insulina.....	65
3. Preparación de la solución con ¹²⁵ I-insulina.....	66
4. Preparación de la curva estándar de insulina.....	66
5. Preparación de las muestras.....	67
6. Separación de la insulina libre de la ligada al anticuerpo.....	67
7. Representación de la curva estándar y cálculo de la concentración de insulina.....	67
2.2.2. FLUORESCENCIA POR TRANSFERENCIA DE ENERGÍA DE RESONANCIA.....	68
3. ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS.....	70
3.1. Incubación estática de islotes pancreáticos.....	70
3.2. Cuantificación de aminoácidos.....	70
4. VALORACIÓN DE DNA.....	71
5. MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE NUCLEÓTIDOS DE ADENINA.....	72
5.1. Incubación estática y extracción de islotes pancreáticos.....	73
5.2. Determinación del contenido de ATP y ADP en los extractos de islotes.....	73
6. EXPRESIÓN DE LUCIFERASA RECOMBINANTE EN CÉLULAS AISLADAS DE ISLOTES Y EN CÉLULAS INS-1.....	74
A. Aislamiento de islotes mediante gradiente (<i>Histopaque</i>).....	75
B. Aislamiento de células pancreáticas por disociación de islotes.....	75
C. Transfección con adenovirus expresante de luciferasa.....	75
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	76

RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE HEMICANALES EN ISLOTES PANCREÁTICOS DE RATA.....	79
1.1. EFECTO DE LA DEPOLARIZACIÓN EN EL CONTENIDO Y LIBERACIÓN DE AMINOÁCIDOS. ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN CON MEFLOQUINA.....	79
1.2. EFECTO DE LA DEPOLARIZACIÓN EN EL CONTENIDO DE ATP Y EN EL COCIENTE ATP/ADP.....	82
1.2.1. Efecto de la depolarización sobre el contenido de ATP producido por glucosa y otros sustratos metabolizables.....	83
1.2.2. Comparación del efecto de la glucosa y análogos no metabolizables sobre la disminución del contenido de ATP inducida por depolarización.....	84
1.2.3. Estudio de la captación de ATP extracelular en islotes en condiciones depolarizantes...	85
1.3. EFECTO DE LA DEPOLARIZACIÓN SOBRE LA SECRECIÓN DE INSULINA INDUCIDA POR NUTRIENTES SECRETAGOGOS. EFECTO DE LA MEFLOQUINA.....	88
1.4. CARACTERIZACIÓN <i>IN VITRO</i> DE HEMICANALES EN CÉLULAS AISLADAS.....	92
1.4.1. Efecto de la depolarización en células aisladas de islotes de rata.....	93
1.4.2. Efecto de la depolarización en células INS-1.....	95
2. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE HEMICANALES EN ISLOTES PANCREÁTICOS DE RATONES <i>KNOCK-OUT</i> PARA LA Cx36 (Cx36-KO).....	97
2.1. EFECTO DE LA DEPOLARIZACIÓN EN EL CONTENIDO Y LIBERACIÓN DE AMINOÁCIDOS.....	97
2.2. EFECTO DE LA DEPOLARIZACIÓN EN EL CONTENIDO DE ATP Y EN EL COCIENTE ATP/ADP.....	98
2.2.1. Comparación del contenido de ATP y del cociente de ATP/ADP en islotes de ratones Cx36 ^{+/+} , Cx36 ^{+/-} y Cx36 ^{-/-} en condiciones basales o depolarizantes.....	98
2.2.2. Estudio de la captación de ATP extracelular en islotes Cx36 ^{+/+} y Cx36 ^{-/-} en condiciones depolarizantes.....	100
2.2.3. Efecto de G20 y MFQ sobre la pérdida de ATP inducida por depolarización en islotes Cx36 ^{+/+}	101
2.2.4. Estudio del efecto de análogos no metabolizables de glucosa sobre la disminución del contenido de ATP inducida por depolarización en islotes Cx36 ^{+/+}	102

2.3. ESTUDIO DE LA SECRECIÓN DE INSULINA EN ISLOTES PERIFUNDIDOS DE RATÓN Cx36 ^{+/+} , Cx36 ^{+/-} y Cx36 ^{-/-}	103
2.3.1. Secreción de insulina inducida por G20 en islotes perifundidos.....	103
2.3.2. Efecto de la MFQ sobre la secreción de insulina en islotes Cx36 ^{+/+}	105
2.3.3. Estudio de la secreción de insulina en islotes expuestos a ATP extracelular en condiciones depolarizantes. Comparación entre los tres genotipos.....	106
3. ESTUDIO DEL ACOPLAMIENTO ENTRE ATP Y SECRECIÓN DE INSULINA EN ISLOTES PANCREÁTICOS DE RATA.....	111
3.1. DOSIS-RESPUESTA DE ATP SOBRE LA SECRECIÓN DE INSULINA.....	111
3.1.1. Efecto de la MFQ sobre la secreción de insulina estimulada por ATP extracelular en islotes “depolarizados”.....	114
3.1.2. Efecto del cociente ATP/ADP sobre la secreción de insulina estimulada por ATP extracelular en islotes “depolarizados”.....	116
3.2. ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LA GENERACIÓN CITOSÓLICA O MITOCONDRIAL DE ATP Y LA SECRECIÓN DE INSULINA	117
3.2.1. Estudio de la secreción de insulina inducida por metabolitos glucolíticos.....	118
3.2.2. Estudio de la secreción de insulina inducida por metabolitos mitocondriales.....	123
3.2.3. Producción de ATP inducida por metabolitos glucolíticos o mitocondriales.....	124

DISCUSIÓN

1. IMPORTANCIA FUNCIONAL DE LA COMUNICACIÓN CELULAR EN ISLOTES.....	139
2. MECANISMO DE ACOPLAMIENTO ENTRE ATP Y SECRECIÓN DE INSULINA.....	136

CONCLUSIONES	145
---------------------------	------------

BIBLIOGRAFÍA	149
---------------------------	------------

ABREVIATURAS

2-OG	2-oxoglutarato
BCAT	Transferasa de aminoácidos de cadena ramificada
BSA	Albúmina bovina sérica
cAMP	AMP cíclico
CBX	Carbenoxolona
cpm	Cuentas por minuto
Cx	Conexina
DM	Diabetes Mellitus
DPK	1,3-difosfoglicerato quinasa
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EGTA	Ácido etilenglicol-bis(b-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetracético
FLU	Ácido flufenámico
FRET	Fluorescencia por transferencia de energía de resonancia
G6P	Glucosa-6-fosfato
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GABA-T	GABA transaminasa
GAD	Descarboxilasa del ácido glutámico
GAP	Gliceraldehído-3-fosfato
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GDH	Glutamato deshidrogenasa
IDDM	<i>Insulin Dependent Diabetes Mellitus</i>
KC	α -cetocapróico
KIC	α -cetoisocapróico
KMV	α -cetometilvalérico
KRBH	<i>Krebs-Ringer</i> bicarbonato
LDH	Lactato deshidrogenasa
MCT	Transportador de monocarboxilatos
MFQ	Mefloquina
MODY	<i>Maturity-Onset Diabetes of the Young</i>
NIDDM	<i>Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus</i>
NPPB	Ácido 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino)-benzoico
OPA	o-ftalaldialdehído
OAA	oxalacetato
PBS	Tampón fosfato salino
PCA	Ácido perclórico

PEP	Fosfoenolpiruvato
PEPCK-M	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa mitocondrial
PIR	Piruvato
PK	Piruvato quinasa
Px	Panexina
SSA	Semialdehído succínico
SUCC	Succinato
TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ciclo de Krebs)
VAMP	Proteína de membrana asociada a vesículas
VDCCs	Canales de calcio dependientes de voltaje

RESUMEN

La secreción de insulina es un proceso multicelular que resulta de la activación coordinada de las células que componen los islotes pancreáticos. Se ha descrito que las moléculas implicadas en la sincronización celular necesaria para una respuesta óptima de la hormona son proteínas de la familia de las conexinas (Cx). Además, se ha observado que no sólo forman canales intercelulares (“*gap junctions*”) entre células vecinas, sino que también podrían formar “hemicanales” (conexonas) que permitirían la comunicación con el medio extracelular. Se ha demostrado que alteraciones en esta proteína y por lo tanto en la comunicación intercelular pueden estar asociadas a procesos diabetogénicos.

Para profundizar en el conocimiento de la funcionalidad de estos canales y su implicación en el mecanismo de secreción de insulina, se ha realizado la caracterización funcional de los “hemicanales” mediante un modelo experimental de islotes “*permeabilizados*” con una depolarización elevada. Por ello, nos propusimos estudiar el efecto que pudieran tener estas condiciones depolarizantes tanto en la respuesta secretora estimulada por determinados secretagogos, como en la difusión de determinados metabolitos (nucleótidos de adenina y aminoácidos). Los resultados obtenidos nos han permitido dilucidar aspectos novedosos en el funcionamiento de los “hemicanales” mediante el estudio con inhibidores específicos y con un modelo *knock-out* para la Cx36 (isoforma predominante en célula β), destacando el importante papel de estos “hemicanales” en el mecanismo de secreción y resaltando la importancia de la glucosa como posible regulador fisiológico de éstos.

Como segundo objetivo se propuso analizar el mecanismo de acoplamiento entre la generación intracelular de ATP y la secreción de insulina, usando como modelo experimental los islotes “*permeabilizados*” en condiciones depolarizantes. Es sabido que la glucosa es el principal nutriente estimulador de la secreción de insulina mediante la producción de ATP, pero el proceso metabólico (glucólisis u oxidación mitocondrial) que estaría más íntimamente ligado al proceso secretor es un tema aún por esclarecer. Así, los resultados obtenidos sobre el efecto de concentraciones variables de ATP extracelular en la secreción y la estimulación inducida por determinados metabolitos (glucolíticos o mitocondriales), podrían destacar la importancia del proceso glucolítico sobre la oxidación mitocondrial en el mecanismo de secreción de insulina. Esto podría ayudar a profundizar en el estudio de posibles dianas para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas antidiabéticas.

INTRODUCCIÓN

1. DIABETES MELLITUS

La Diabetes Mellitus (DM) es el desorden endocrino conocido más común, registrándose que en el año 2010 más de doscientos millones de personas (aproximadamente el 6% de la población mundial) padecían severas complicaciones diabéticas y estimándose que para el año 2025 podrían padecerlo unos 300 millones [1]. Según la Fundación Española de Diabetes, sólo en España se ha descrito que existen en la actualidad más de dos millones y medio de personas con esta enfermedad y que podrían superar los tres millones en los próximos 15 años (**figura 1**).

Esta enfermedad es un desorden metabólico que resulta de un defecto en la secreción de insulina y/o una acción de ésta sobre los tejidos periféricos. Estas deficiencias pueden provocar una hiperglucemia crónica y alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, ácidos grasos y proteínas que llevan asociado daño a largo plazo, disfunciones y fallo de varios órganos, especialmente en ojos (retinopatía), riñón (nefropatía) y sistema cardiovascular [2].

Los criterios de diagnóstico y la clasificación de los tipos de DM han sido publicados tanto por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como por la Asociación Americana de Diabetes (ADA): los síntomas de la enfermedad pueden ser poliuria, polidipsia, pérdida de peso corporal, etc. Y los umbrales de glucosa en plasma en situación de ayuno y post-pandrial por encima de 7.0 mmol/l (126 mg/dl) y 11.1 mmol/l (200 mg/dl), respectivamente y de 200 mg/ml también durante el test de tolerancia a la glucosa de dos horas con un aporte de 75 g de glucosa en agua, podrían ser también asociados al diagnóstico de la enfermedad.

Dependiendo de la causa que da lugar a la enfermedad, se pueden distinguir varios tipos [3]:

- **Diabetes Mellitus Tipo I:** También conocida como “insulino-dependiente” (IDDM, *Insulin Dependent Diabetes Mellitus*), se presenta principalmente en jóvenes, en su mayoría, durante la infancia. El páncreas pierde su capacidad de producir insulina por la destrucción de las células productoras de la hormona y por lo tanto se requiere terapia con aporte insulínico para sobrevivir.
- **Diabetes Mellitus Tipo II:** También conocida como “no insulino-dependiente” (NIDDM, *Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus*), se caracteriza por un déficit relativo de producción de insulina y una deficiente utilización periférica por los tejidos de glucosa (resistencia a la insulina), por lo que es necesario un control de la hormona. Es la más común y se desarrolla

sobre todo en etapas adultas de la vida, asociándose frecuentemente con la obesidad y el sedentarismo.

- **Diabetes Mellitus Gestacional:** Es provocada por una alteración del metabolismo de los carbohidratos durante la etapa de gestación, que pueden llegar a provocar complicaciones en el feto e incluso incrementa el riesgo de padecer DM2 posteriormente tanto en la madre como en el niño.
- **Otros tipos de diabetes:** Incluyen defectos genéticos de las células β pancreáticas o en las rutas de acción de la insulina, así como patologías del páncreas exocrino (pancreatitis o fibrosis quística), endocrinopatías producidas por excesos de hormonas contrarreguladoras (síndrome de Cushing, acromegalia), etc. Además también pueden darse diversos tipos de formas monogénicas de DM como la diabetes tipo MODY (*"Maturity-Onset Diabetes of the Young"*), de herencia familiar autosómica que presenta defectos primarios en la secreción de insulina.

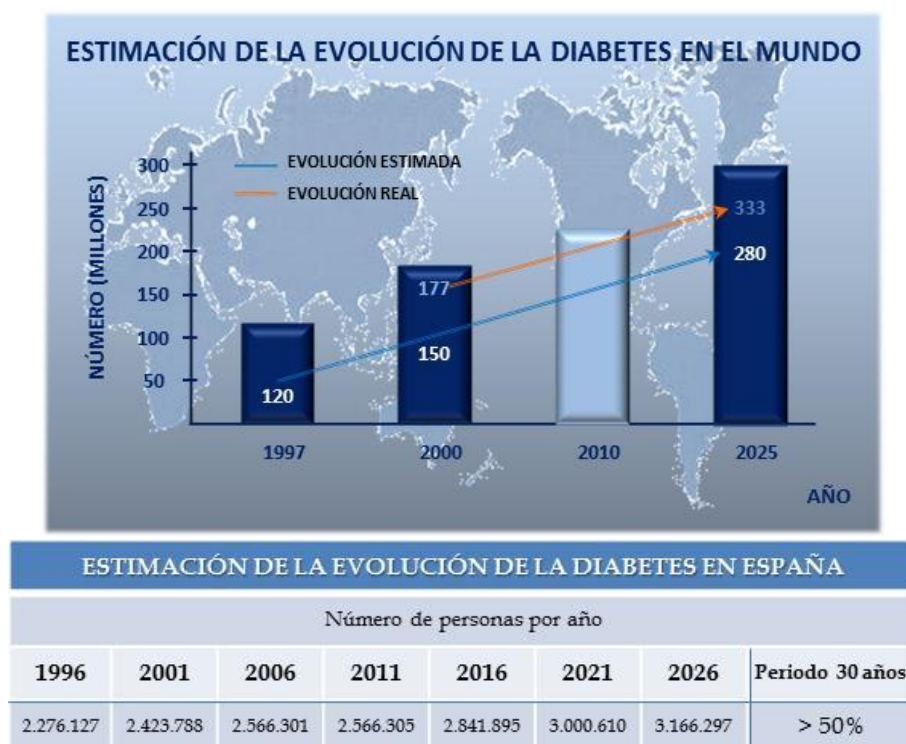


Figura 1. Prevalencia de la Diabetes Mellitus en el mundo y en España. A pesar de los avances en el tratamiento y prevención, la prevalencia de la diabetes ha aumentado de manera más drástica de lo esperado: en 1997 había 120 millones de diabéticos en el mundo y se esperaba que la cifra alcanzara a 150 millones en el año 2000; sin embargo, llegó a 177 millones de personas, lo que proyectado a 2025 daría una estimación de 333 millones de personas con DM. A menor escala, la evolución de personas con complicaciones diabéticas en España ha incrementado alrededor de doscientas mil personas cada 5 años, lo que situaría el número de personas con esta enfermedad en más de tres millones de personas en el año 2025.

1.1. DIABETES MELLITUS TIPO 1

La Diabetes Mellitus Tipo 1 (DM1) resulta de una destrucción progresiva de las células β pancreáticas de forma autoinmune mediada por los linfocitos T del sistema inmunitario, lo que requiere un aporte de insulina para la supervivencia del paciente. Sin embargo, los eventos que llevan a esta destrucción celular no están totalmente esclarecidos en la actualidad. Diversos autoantígenos contra células β han sido implicados en el desarrollo de esta autoinmunidad [4]. Se han identificado tres principales autoantígenos: la descarboxilasa del ácido glutámico (isoforma de 65kDa, identificada en las células β pancreáticas, GAD65), una proteína de la familia de las tirosina-fosfatasa (IA-2) y la propia insulina. Aunque se han descrito otros autoantígenos diferentes a éstos (el transportador de glucosa GLUT-2, la Carboxipeptidasa H, la proteína hsp 65, el receptor de insulina), diversos estudios han determinado que alrededor de un 90% de los individuos diagnosticados como Tipo 1, poseen al menos uno de los tres autoantígenos anteriormente descritos [5].

Sin embargo, existen otros factores que pueden influir en el desarrollo de este tipo de diabetes, como factores ambientales y genéticos que pueden dar lugar a la autoinmunidad desencadenada que provoca la enfermedad. Mientras que la susceptibilidad genética a la DM1 se rige a través de la región HLA que codifica para proteínas involucradas en el reconocimiento y presentación del antígeno, la respuesta inmune es lo que explica la etiología de la enfermedad. Existen dos hipótesis que explican la destrucción de las células β pancreáticas: una primera en la que se afirma que la presentación de un antígeno de estas células al receptor CD4-positivo de los linfocitos T en el contexto de una molécula de HLA y la consecuente cascada de eventos, lleva a la destrucción de las células que expresan la diana del antígeno y una segunda en la que están implicados procesos inflamatorios producidos por una respuesta inmune a un antígeno no propio, pero que contiene una secuencia homóloga a uno que sí lo es (“mimetismo molecular”) [6].

Es sabido que existen dos isoformas del GAD (GAD65 y GAD67) expresadas tanto en células del sistema nervioso, como en las células de los islotes pancreáticos; sin embargo, los pacientes con un estado pre-diabético diagnosticado presentaban anticuerpos específicos de la isoforma GAD65, lo que llevó al estudio de ésta de una manera más incisiva [7]. Así, en un estudio publicado por el grupo de *Ji-Won Yoon*, desarrollaron un modelo de ratones NOD en los que, a través de la inserción de un transgén antisentido del GAD, son capaces de bloquear la expresión del enzima [4]. Esto inhibía el desarrollo de la enfermedad, suprimiendo la generación de células T diabetogénicas frente a las células β . Por lo tanto, la demostración

de que la autoinmunidad producida sobre esta proteína es la que desarrolla, en su mayor parte, la diabetes tipo 1, podría tener importantes repercusiones para el desarrollo de estrategias terapéuticas en un futuro. Por ejemplo, el trasplante de islotes con una expresión del GAD disminuida por el uso de un transgén antisentido o la expresión de péptidos del propio autoantígeno del enzima en la mayoría de los tejidos, incluido el timo, para potenciar por sí mismo una tolerancia específica al GAD, podría ser beneficioso para pacientes con este tipo de diabetes.

Otras patologías como la enfermedad de *Grave*, *Hashimoto* (tiroiditis) o *Addison* podrían estar relacionadas con el desarrollo de DM1, ya que algunos de estos pacientes cursan con una insulinopenia permanente y cetoacidosis propias de este tipo de diabetes, aunque no ha sido demostrada la autoinmunidad en estas patologías [8].

1.2. DIABETES MELLITUS TIPO 2

La Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) es la forma de diabetes más común y es el resultado de un déficit en la secreción de insulina por parte de las células β y una resistencia a la acción de la hormona en los tejidos periféricos. Un aporte excesivo de nutrientes podría dar lugar a una hiperglucemia y una concentración de ácidos grasos libres que impactarían negativamente sobre la función celular. Esto puede suceder por diversos mecanismos, que incluyen la generación de especies reactivas de oxígeno, alteraciones en rutas metabólicas, incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular y la aparición de mecanismos de estrés. Estos procesos afectarían a las funciones celulares decreciendo la expresión y secreción de insulina y causando por lo tanto pérdida de masa celular por apoptosis [9].

Normalmente la mayoría de los pacientes que sufren DM2 se asocia a la obesidad. Incluso el exceso de peso podría provocar por sí mismo una resistencia a la insulina, aunque existen individuos que podrían tener una hipersecreción de insulina compensatoria con el objetivo de mantener niveles normales de glucemia. Sin embargo, los enfermos de DM2 no son capaces de tener esta respuesta compensatoria, ya que existe un mal funcionamiento de las propias células β , derivando en un progresivo deterioro en la función celular [10].

La resistencia a la insulina podría ser parcialmente reducida con una disminución del peso y/o con un tratamiento farmacológico para la hiperglucemia, aunque raramente se consigue una restauración a valores normales. El riesgo de desarrollar esta enfermedad aumenta con la edad, con el peso y con la carencia de actividad física. Por lo tanto, modificaciones en la dieta y en el estilo de vida podrían servir de prevención y tratamiento para la DM2. Se ha

descrito además que ocurre más frecuentemente en mujeres con diabetes mellitus gestacional y en pacientes con hipertensión y dislipidemia, además de la diferencia entre razas y que podría estar también asociada a una fuerte predisposición genética, aunque todavía es un tema que no está claramente definido [11].

En resumen, en algunos individuos con DM, un control adecuado de la glucemia puede ser resultado de una reducción del peso, de un aumento en la actividad física y/o de agentes que disminuyan los niveles de glucosa en sangre. Estos pacientes no requieren tratamiento con insulina sino simplemente un control de ésta (DM2, GDM y otros tipos). Sin embargo, otros individuos sí que requieren un aporte exógeno de insulina para tener controlada la glucemia (DM1). Además, el grado de hiperglucemia puede cambiar con el tiempo, dependiendo de la amplitud del proceso patológico asociado. Así, la enfermedad puede presentarse pero podría no causar una hiperglucemia. Por ejemplo, el mismo proceso patológico puede causar disminución de la tolerancia a la glucosa y/o del umbral de glucosa en sangre en ayuno sin tener un criterio de diagnóstico absoluto de la enfermedad. Por lo tanto, el grado de hiperglucemia refleja la severidad de los procesos metabólicos asociados y su tratamiento, más que la naturaleza del proceso en sí (**figura 2**) [11].

Estados Tipos de diabetes	NORMOGLUCEMIA	HIPERGLUCEMIA			
	Regulación de glucosa	Disminución tolerancia glucosa o del umbral de glucosa en ayuno	Diabetes Mellitus		
			No requerimiento insulina	Requerimiento control insulina	Requerimiento insulina para supervivencia
Pre-diabetes		✓			
Tipo 1 (DM1)*	✓*				✓
Tipo 2 (DM2)				✓	
Gestacional (GDM)**				✓	✓**
Otros tipos (MODY,...)**				✓	✓**

Figura 2. Alteraciones de la glucemia. Tipos de diabetes y estados. *Incluso después de padecer cetoacidosis, estos pacientes (DM1) en ocasiones pueden sufrir el llamado efecto "honeymoon", donde retornan por un espacio corto de tiempo a valores normoglucémicos sin requerir tratamiento insulínico. **Estos pacientes, en raras ocasiones (como la DM1 observada en embarazadas) requieren insulina para sobrevivir.

2. ISLOTES DE LANGERHANS

Los islotes pancreáticos son asociaciones de células que conforman la parte endocrina del páncreas. Estas agrupaciones fueron descubiertas por *Langerhans* (de ahí su nombre) a mediados del siglo XVIII, pero no fue hasta finales de este mismo siglo cuando fue descubierta su función endocrina [12].

La regulación de la glucemia por parte del islote depende principalmente de la función individual de las diferentes poblaciones celulares que lo integran y de la interacción entre éstas. En humanos, alrededor de un millón de estos islotes constituyen el órgano pancreático. La masa de células endocrinas apenas supera el 1% del total del órgano y se agrupan en poblaciones de 1000-3000 células llamadas islotes. El tipo celular predominante corresponde a la célula β pancreática, responsable de la secreción de insulina, mientras que la célula α secretora de glucagón y la célula δ secretora de somatostatina están representadas en una menor proporción. Si bien en ratón la célula β constituye alrededor del 70-80% del islote y la célula α en torno al 20%, estudios recientes en humano han demostrado una presencia mayor de células α (55% de células β frente a un 40% de α). En el caso de las células δ , pueden llegar a constituir el 10% del total del islote [12] (**figura 3**).

Existen además otros tipos celulares minoritarios como las células PP productoras del polipéptido pancreático, células ϵ productoras de grelina, algunos fibroblastos, linfocitos y macrófagos que constituyen menos del 1% [12].

Así, un gran número de trabajos científicos han sido dirigidos al estudio de la célula β y el mecanismo de secreción de insulina, de manera que hoy en día se tiene un gran conocimiento de la regulación de este tipo celular.

Si bien los estudios en líneas celulares y en células del islote aisladas aportan información relevante sobre la respuesta específica de una célula o tipo celular, sería preciso estudiar también esta respuesta en el islote intacto, pues es en este escenario donde se integran los diferentes mecanismos de comunicación célula-célula, aproximándose en mayor medida a la realidad fisiológica [12].

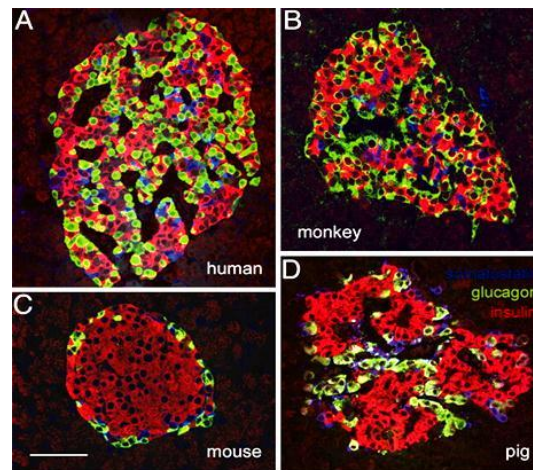


Figura 3. Microscopía confocal de secciones de islotes pancreáticos de humano (A), mono (B), ratón (C) y cerdo (D), tratados inmunquímicamente con anticuerpos anti-insulina (color rojo, células β), anti-glucagón (color verde, células α) y anti-somatostatina (color azul, células δ) [13].

3. CÉLULA β

En general, prácticamente todas las células del organismo poseen lo que se llama un “potencial de membrana en reposo”, generado por la existencia de un trasiego de iones a través de una serie de canales iónicos que se encuentran en la membrana plasmática. Este flujo de iones genera una diferencia de potencial a ambos lados de la membrana, el cual, cuando se ve modificado por la llegada de un estímulo (impulso eléctrico como en el caso de las células del sistema nervioso, un estímulo metabólico como consecuencia de la generación de ATP, etc.), se produce la activación de la célula y por consiguiente el desarrollo de las funciones celulares determinadas.

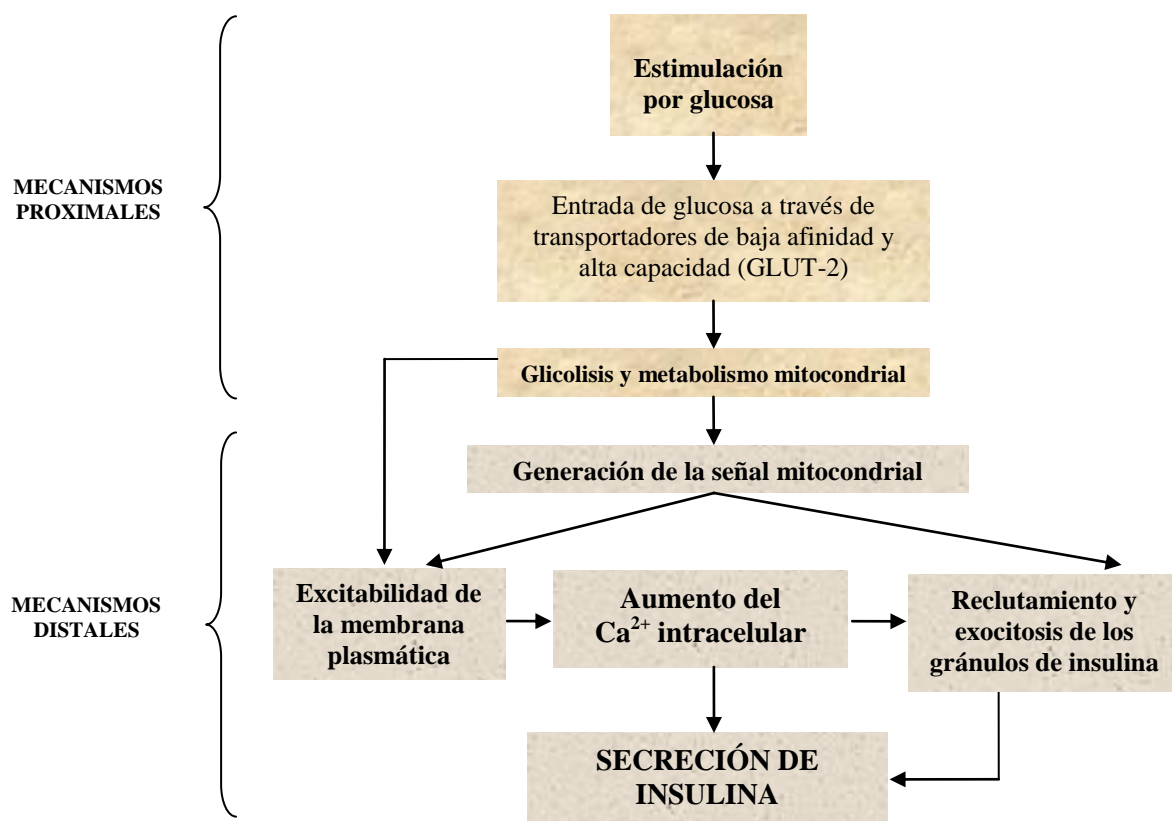
Es una idea universalmente aceptada que en el grupo de células que poseen una señalización y activación metabólica se encuentran las *células β* . Como cualquier tipo de célula, poseen un potencial de membrana en reposo que está generado por la existencia en su membrana de diferentes tipos de canales que regulan el flujo de iones a través de ésta y que determinan esta señalización y activación de una manera metabólica. En este caso, el principal estímulo que permite desarrollar la principal función de este tipo de célula (secreción de insulina) es el metabolismo de la glucosa [14].

Las células β pancreáticas son capaces de ajustar la secreción de insulina según los niveles prevalecientes de glucosa en sangre, siendo esta hormona sumamente importante para la captación de glucosa por parte de los tejidos para su utilización como fuente de energía y para su almacenamiento en forma de glucógeno. Este tipo de células se comportan como verdaderos *sensores de glucosa*, ya que su función es esencial para el mantenimiento de la ho-

meostasis del azúcar (el nivel plasmático de la glucosa es uno de los parámetros más regulados en humanos, debido, principalmente, al equilibrio entre la liberación de insulina, por un lado y a la acción de otras hormonas contrarreguladoras, por otro). Esto se demuestra, por ejemplo, por el papel que estas células juegan en la patogénesis de la DM2, ya que un defecto relativo en la respuesta de insulina a glucosa es la causa principal para el desarrollo de la resistencia a la hormona que se experimenta en esta enfermedad [14].

3.1. Mecanismo de secreción de insulina. Acoplamiento estímulo-secreción

Como se ha comentado anteriormente, el principal estímulo que desencadena la secreción de insulina por parte de las células β es el metabolismo de la glucosa. Los mecanismos que componen el esquema de acoplamiento estímulo-secreción están ampliamente aceptados y, en general, se dividen en dos grupos: primero están los “mecanismos proximales” que engloban la entrada y metabolismo de la glucosa y segundo los “mecanismos distales” donde entran en juego la generación de la señal mitocondrial y la iniciación de la actividad eléctrica que desemboca en la secreción de los gránulos de insulina [14] (ver esquema siguiente).



3.1.1. Metabolismo de la glucosa

Principalmente son tres las características que determinan el metabolismo de la glucosa en las células β . En primer lugar, el equilibrio de la concentración de glucosa a ambos lados de la membrana por la entrada de ésta al interior celular a través del transportador de glucosa GLUT-2 (un transportador de baja afinidad y alta capacidad) [15]. Segundo, la fosforilación de la glucosa por parte de la *glucoquinasa* (GK, *hexoquinasa IV*) de alta K_m con el consiguiente gasto de ATP. Esto constituye lo que se denominó el sistema *glucosensor*, que permite a la célula detectar las variaciones de glucosa en plasma y responder fisiológicamente [16]. Y tercero, el desarrollo de los siguientes pasos enzimáticos de la glucólisis para producir piruvato, NADH, ATP y otros mediadores.

A pesar de que es sabido que el piruvato por sí solo (y su forma permeable de membrana, metil-piruvato) no son estimuladores de la secreción de insulina [17], sí que se ha sugerido que el metabolismo mitocondrial del piruvato es importante en el mecanismo de secreción de insulina estimulada por glucosa. Las células β podrían expresar niveles bajos de la lactato deshidrogenasa (enzima que cataliza la conversión de piruvato a lactato) [18, 19] y esto impide el desvío del piruvato de las rutas metabólicas mitocondriales [20], aunque esto es todavía un tema de debate. El piruvato entraría en la mitocondria (a través del transportador de monocarboxilatos (MCT) [21] y activaría el “ciclo de los ácidos tricarboxílicos” (TCA o ciclo de Krebs) generando ATP y poder reductor (NADH y FADH₂). El NADH generado en el citosol mediante la glucólisis sería transportado a la mitocondria por medio de los denominados “sistemas lanzaderas” (*lanzadera glicerol-fosfato* y *malato-aspartato*), las cuales podrían jugar un papel importante en la regulación de la secreción de insulina, ya que el bloqueo de ambas inhibe la respuesta celular a glucosa [22]. Tanto el poder reductor generado en el citosol (NADH) y transportado al interior mitocondrial, como el generado en la mitocondria en el ciclo de Krebs (NADH y FADH₂) entran en la cadena respiratoria mitocondrial y activan el transporte de electrones en los diferentes complejos que la conforman. A partir de ahí se crea un gradiente de H⁺ a ambos lados de la membrana mitocondrial interna que es aprovechado por la ATP sintasa para generar ATP. Además, la hiperpolarización de la membrana mitocondrial interna por el bombeo de H⁺ fuera de la matriz mitocondrial estimula el *uniporter* de Ca²⁺ dependiente de potencial que incrementaría la concentración de Ca²⁺ intramitocondrial; esto podría favorecer el transporte de ATP hacia el citosol, aumentando así la concentración de ATP y el cociente ATP/ADP [23].

3.1.2. Otros nutrientes secretagogos

Existen evidencias experimentales que indican que no sólo el metabolismo de la glucosa es capaz de inducir una respuesta secretora, sino que otros nutrientes también poseen esta capacidad.

Así, se le llamó “*nutriente secretagogo*” a aquella sustancia capaz de, a través de su metabolismo, generar suficiente energía como para estimular la secreción de insulina. En 1981, *Malaisse y cols* postularon la “hipótesis del combustible”, donde señalan que la respuesta secretora de insulina a determinados nutrientes depende de su capacidad para aumentar la producción de ATP en las células β [24]. Por lo tanto, además de la glucosa, existen otras sustancias que son capaces de inducir una respuesta secretora.

En este sentido, es sabido que algunos aminoácidos juegan un papel importante en la regulación de la secreción de insulina en las células β pancreáticas, aunque hoy día no está del todo claro cuál es el mecanismo molecular por el cual estos aminoácidos ejercen este papel [25]. Por ejemplo, existen aminoácidos como la leucina capaces de inducir una curva monofásica de secreción de insulina, la cual se convierte en bifásica si se suministra simultáneamente con glutamina [26]. Esta estimulación por parte de la leucina podría ser por dos mecanismos diferentes: el primero a través de la transaminación de la propia leucina para dar α -cetoisocaproato (KIC) y la consiguiente oxidación mitocondrial de este último y el segundo a través de una activación alostérica de la glutamato deshidrogenasa (GDH), causando la desaminación del glutamato para dar el α -cetoglutarato (intermediario del ciclo de Krebs). A este segundo mecanismo se le dio una gran importancia por el descubrimiento de una forma dominante de hiperinsulinismo congénito asociado a mutaciones en la GDH, donde la sensibilidad a ser inhibido por GTP o ATP estaba disminuida [27].

Así, algunos autores atribuyeron a la GDH un papel esencial en la secreción de insulina estimulado por glucosa y asumen que la enzima cataliza la reacción enzimática en el sentido de producción del glutamato, el cual fue propuesto como un mensajero mitocondrial que asociaba el metabolismo celular con la secreción de insulina [28]. Además, estos mismos autores en otro estudio sugirieron que los bajos niveles de GDH existentes en islotes de ratón deberían explicar la no existencia de la segunda fase de secreción de insulina comparado con la predominante segunda fase observada en islotes tanto de humanos como de rata [29]. Esta teoría, sin embargo, ha sido rebatida en años posteriores por otros trabajos, indicando que,

aunque la GDH sí es capaz de trabajar en el sentido de producción de glutamato, la dirección predominante en condiciones fisiológicas es la de oxidación del mismo [27].

Por otra parte, también se ha demostrado que algunos α -cetoácidos como el α -cetoisocaproico (KIC), el α -cetometilvalérico (KMV) o el α -cetocaproico (KC), pueden actuar como nutrientes segretagogos estimulando una secreción bifásica de insulina [24]. En un trabajo publicado por nuestro grupo [30], se demostró que estos α -cetoácidos de cadena ramificada inducían una respuesta secretora mediante la reacción de transaminación con el glutamato catalizada por la BCAT (*“transferasa de aminoácidos de cadena ramificada”*) para dar 2-oxoglutarato (2-OG). Este 2-OG era a su vez transaminado por la GABA-T (*“GABA transaminasa”*) resultando en un incremento en el metabolismo del GABA, entrando de nuevo al ciclo de Krebs mediante el semialdehído succínico (SSA) y manteniendo así la generación de ATP necesaria para la estimulación de la secreción de insulina.

3.1.3. Mecanismo de secreción dependiente de K_{ATP} (*“fase de iniciación”*)

Se ha demostrado que la “señal” por la cual una concentración de nutriente estimulante incrementa la secreción de insulina vendría dada por el metabolismo en las células β y que los canales de K^+ dependientes de ATP (K_{ATP}) podrían ser el nexo entre el metabolismo y la actividad eléctrica de estas células [31]. Así, la elevación de los niveles de ATP y como consecuencia del cociente ATP/ADP, da lugar al cierre de los canales K_{ATP} que se encuentran en la membrana plasmática de las células β , provocando una depolarización de ésta y desencadenando la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje (VDCCs). La entrada de Ca^{2+} aumenta la concentración intracelular del catión, provocando la fusión de las vesículas de insulina a la membrana y la consecuente secreción de la hormona [32] (**figura 4**). Finalmente, la apertura de los canales de potasio dependientes de voltaje (K_v) restablece los potenciales de acción hasta su estado basal, limitando la entrada de calcio y cesando la liberación de insulina [33].

Sin embargo, ha sido aceptado que un bloqueo de los canales K_{ATP} con sulfonilureas, así como una depolarización de las células β con una concentración elevada de K^+ que provoque la apertura de los canales de Ca^{2+} , sería suficiente para iniciar una respuesta secretora de insulina [34]. Por lo que el aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} es esencial para que tenga lugar la fase de iniciación de la respuesta y el responsable de la generación de la primera fase de secreción.

Además, es sabido que la pérdida de la respuesta secretora en esta 1ª fase parece jugar un papel importante en la patogénesis de la diabetes tipo 2 y por lo tanto el estudio de los mecanismos que dan lugar a esta respuesta podrían tenerse en cuenta para una posible restauración de tipo farmacológico [35].

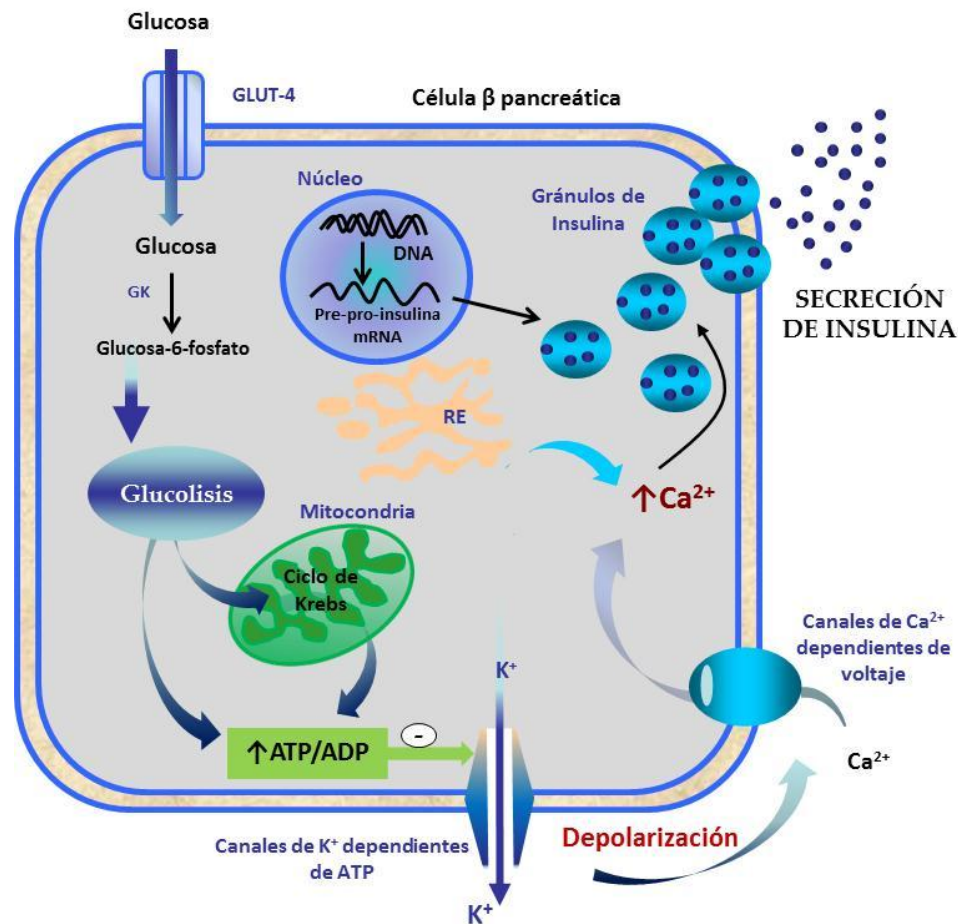


Figura 4. Esquema básico del mecanismo de secreción de insulina. El aumento del cociente ATP/ADP mediante el metabolismo de la glucosa tanto en el citosol (glucólisis) como en la mitocondria (oxidación mitocondrial) provoca el cierre de los K_{ATP} (canales de K^+ dependientes de ATP) que da lugar a una depolarización de la membrana plasmática. La apertura de los VCCD (canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje) da lugar a la entrada de Ca^{2+} que provoca la exocitosis de las vesículas de insulina. GLUT-4 (transportador de glucosa), GK (glucocinasa) RE (retículo endoplasmático).

3.1.4. Mecanismo de secreción independiente de K_{ATP} (“fase de amplificación”)

Se ha demostrado desde hace tiempo que la glucosa y determinados nutrientes a concentraciones estimulantes, son capaces de inducir una secreción de insulina que muestra una curva bifásica de liberación (1ª y 2ª fase). Como se ha explicado anteriormente, una depolarización de las células β de manera dependiente de los canales K_{ATP} mediante el metabolismo de la glucosa, da lugar a una iniciación de la respuesta secretora (1ª fase). Sin embargo, la

aparición de una segunda fase de secreción ha sido un tema bastante estudiado por diversos autores.

El término “fase de amplificación” fue propuesto por Henquin [36] donde explicaba que, además de una fase de iniciación, existía una fase que era independiente de los canales K_{ATP} y que había diversos mecanismos que relacionaban el metabolismo de ciertos nutrientes con la regulación de la secreción de insulina sin que hubiera más cambios en la actividad eléctrica de las células. Se ha estudiado la influencia de la glucosa sobre la secreción independientemente de los canales K_{ATP} y se ha demostrado su capacidad para incrementar la secreción de insulina en islotes de ratón y rata “depolarizados” con KCl en presencia de diazóxido y en los cuales los canales K_{ATP} se mantenían abiertos farmacológicamente [37, 38]. Además, en otro trabajo se demostró que la glucosa estimulaba la secreción de insulina en islotes de ratón que tenían noqueado el gen que codificaba para la expresión de los canales K_{ATP} , lo que indicaba la existencia de un mecanismo de secreción independiente de estos canales [39].

También se ha publicado que la glucosa potenciaba la secreción de insulina inducida por secretagogos no metabolizables (como la arginina o la tolbutamida) mediante dos mecanismos: un aumento inicial del Ca^{2+} citosólico y una amplificación de la respuesta al propio Ca^{2+} [41]. Y por lo tanto, el entendimiento de este mecanismo de potenciación de la glucosa podría ayudar a dilucidar las razones de las alteraciones en la secreción de insulina en pacientes diabéticos tipo 2.

Más recientemente, se ha descrito que la fase de amplificación podría darse por dos mecanismos diferentes: bien una amplificación metabólica en la que estarían implicados el ATP u otros mensajeros como el cAMP, el NADPH, intermediarios del ciclo del ácido cítrico, etc., bien una amplificación neurohormonal mediante la activación de la PKC o PKA por ACh (acetilcolina) o GLP-1 (péptido similar al glucagón tipo 1) [40] (figura 5).

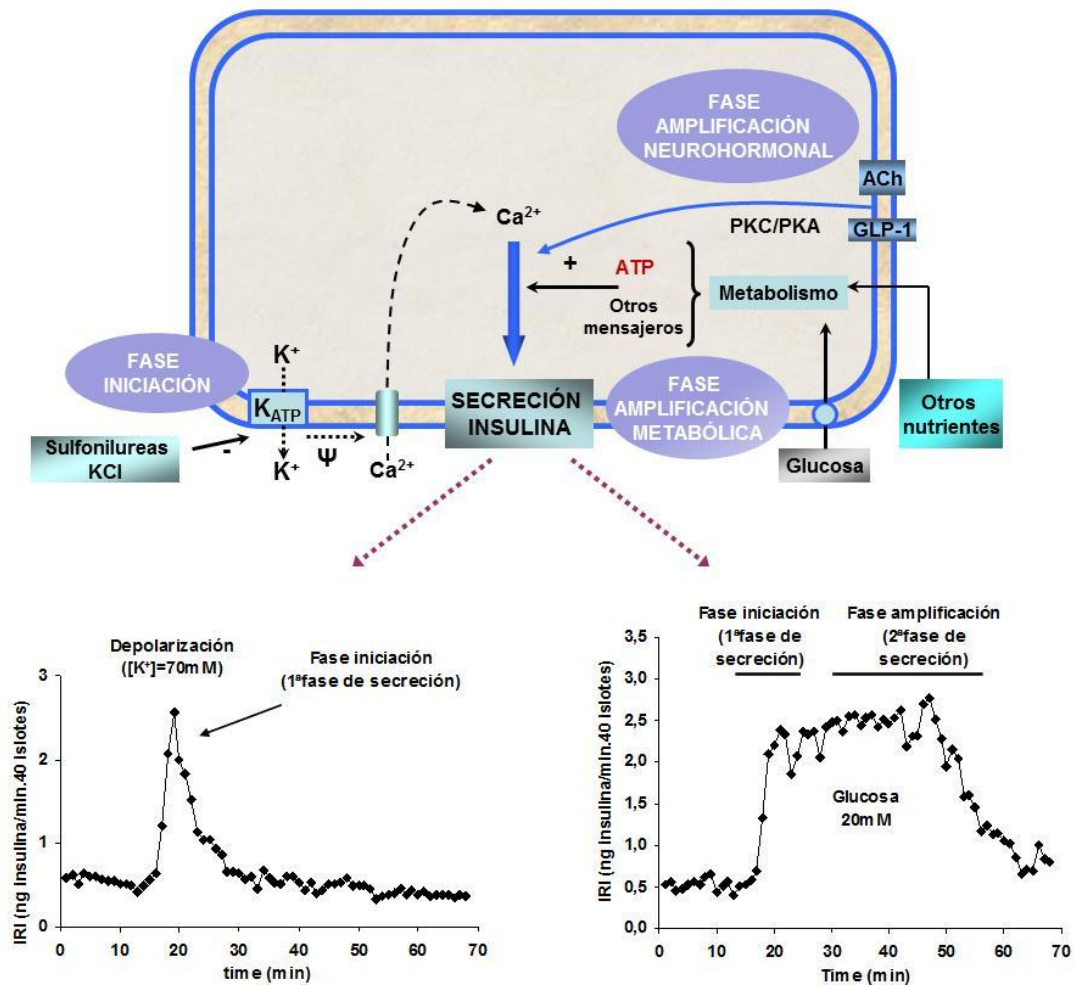


Figura 5. Representación esquemática de las fases de iniciación y amplificación de la secreción de insulina. Curvas de secreción de isletos de ratas expuestos a KCl 70 mM o glucosa 20 mM. K_{ATP} : canales de K^+ dependientes de ATP, VCCD: canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. ψ : depolarización, PKC: proteína quinasa C, PKA: proteína quinasa A, ACh: acetilcolina, GLP-1: "glucagón like peptide 1" (péptido análogo al glucagón tipo 1) (adaptado de [40]).

3.2. Regulación del mecanismo de secreción

Como se ha explicado anteriormente, el ATP es el principal factor que desencadena el cierre de los K_{ATP} y como consecuencia final, la liberación de insulina. Sin embargo, el papel exacto del ATP citosólico o mitocondrial en la regulación de la secreción de la hormona ha sido todavía un tema controvertido. En este sentido, se propusieron diversas hipótesis. Algunos autores sugerían que las oscilaciones del Ca^{2+} que daban lugar a la secreción de insulina se debían a la producción de ATP mitocondrial, ya que la elevación del Ca^{2+} estimulaba el metabolismo por activación de las enzimas mitocondriales [42]. Sin embargo, otros trabajos dieron más importancia a la producción de ATP en la glucólisis, ya que demostraban que algunas de las enzimas glucolíticas a partir de las cuales se genera ATP, podrían modular la

actividad de los canales K_{ATP} necesarios para la respuesta secretora, probablemente por la regulación de los niveles de ATP localmente cercanos a estos canales [43].

Por otro lado, se han aportado datos que señalan que la producción de ATP es insuficiente por sí sola para la regulación fisiológica de la secreción insulínica y que la generación de otras señales mitocondriales podría ser importante para la respuesta celular a glucosa. En este sentido se ha publicado que diversos productos anapleróticos (generados en la mitocondria) como el malato, el citrato o el α -cetoglutarato, podrían ser exportados al citosol y potenciar o mantener la respuesta secretora, aunque su mecanismo de acción es poco conocido [44].

Se propuso además que el *glutamato* podría ser un mensajero en las células β , donde actuaría como una señal de activación de la secreción insulínica [28], pero esta teoría fue contrarrestada por otros trabajos que indicaban que algunos secretagogos (glucosa, leucina, metil éster del ácido succínico, etc.) estimulaban la secreción de insulina pero no aumentaban los niveles intracelulares de glutamato. Además, el incremento de la concentración de dicho aminoácido por adición de glutamina no incrementaba la respuesta insulínica [45].

Otros moduladores propuestos han sido: los *acil-CoA* de cadena larga, que podrían potenciar la secreción de insulina a través de la acilación de proteínas reguladoras o bien por formación de otros metabolitos como el diacilglicerol (DAG), implicado en la activación de la PKC, participando en la potenciación de la segunda fase de secreción [46]; el *NADPH*, equivalente formado en la reacción de formación de piruvato a partir de malato (por el enzima málico), donde la inhibición de la formación de este intermediario, reducía la secreción de insulina estimulada por glucosa [47]; el *cAMP*, que incrementaría la secreción en presencia de glucosa a través de la activación de la PKA y cuyas oscilaciones modulaban la magnitud y la cinética de la exocitosis de los gránulos [48].

Por lo tanto, existen múltiples evidencias que indican la implicación de señales metabólicas independientes de ATP que controlarían la secreción de insulina. Es sabido además que una desregulación de la respuesta secretora marcaría la transición de un estado pre-diabético a un estado hiperglucémico (diabético), por lo que el entendimiento de los mecanismos de regulación dependientes o independientes de ATP facilitaría el estudio y el desarrollo de nuevas terapias para intentar paliar esta enfermedad.

3.3. Mecanismo de exocitosis de los gránulos de insulina

La activación y consecuente apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje que viene precedida de la depolarización de la membrana resulta en un aumento del Ca^{2+} intracelular que estimularía la exocitosis de los gránulos de insulina. Mientras que las variaciones en el potencial de membrana están claramente controladas por glucosa, la distribución y exocitosis de dichos gránulos también estarían igualmente modulados por una respuesta a glucosa fisiológicamente apropiada [14].

Los gránulos de insulina, al igual que las vesículas secretoras de otros numerosos tipos de células, se dividen en varios grupos (“pool”) funcionales dentro de las células β , entre los que se encuentran: un “pool” de reserva intracelular (90%), un “pool” anclados a la membrana (“docked- pool”) (alrededor de un 10%) y un “pool” de liberación rápida (RPP, ‘readily releasable pool’) (0.3-0.2%), los cuales están preparados para ser liberados [49]. El tamaño de estos RPP es el mayor determinante de la magnitud de la iniciación de la respuesta secretora. Mientras que a corto plazo, el cebado de los gránulos ya anclados acontecería en la liberación de los RPP, a largo plazo se daría una movilización de los gránulos de reserva desde el interior celular hasta su anclaje a la membrana. La respuesta exocitótica inicial (primera fase de secreción) se podría dar por un aumento del Ca^{2+} intracelular provocada por cualquier estímulo, llevando a la liberación de las vesículas ancladas a la membrana y las que están ya preparadas. Seguidamente, se produciría la fase de amplificación (segunda fase de la secreción) en la que estarían involucrados únicamente nutrientes secretagogos metabolizables y que sería dependiente de la movilización de los gránulos de reserva hacia la membrana plasmática [14].

- Movilización de los gránulos de secreción: Existen estudios de microscopía de fluorescencia que demuestran que la segunda fase de secreción de insulina resulta de la exocitosis de los gránulos de insulina reclutados a la membrana plasmática [50]. El movimiento de estos gránulos puede ser estimulado por glucosa o por el propio ATP y por agentes que incrementen los niveles de cAMP, donde se observa un aumento de la secreción estimulada por glucosa a partir de un mecanismo dependiente de la PKA (**figura 6**). Los mecanismos moleculares por los que la PKA es capaz de acelerar la movilización de las vesículas hacia la membrana plasmática no están del todo esclarecidos, pero se han aportado datos que indican que puede ejercer una acción similar al que ejerce la proteína sinapsina-1, controlando las interacciones entre las vesículas y los microtúbulos del citoesqueleto [51]. De hecho, es sabido que el desajuste en la red que forman los microtúbulos en el citosol puede interferir negativamente en

el movimiento de los gránulos y por tanto en el inicio de la respuesta exocitótica [52]. En otro trabajo publicado, se propone que los gránulos de insulina son transportados a lo largo de la red microtubular de manera dependiente de ATP, probablemente por una proteína “motor” como es la miosina 5A, la cual a su vez es reclutada a los gránulos por proteínas de unión a GTP, como son las proteínas Rab; por lo que estas proteínas dependientes de GTP podrían también jugar un papel importante en la movilización de los gránulos a la membrana plasmática [53].

- *Exocitosis de los gránulos de insulina*: La regulación de la maquinaria exocitótica ha sido estudiada extensamente en muchos trabajos. En general, se ha demostrado que la fusión de las vesículas con la membrana plasmática está mediada por las proteínas SNARE (**figura 6**). Estas proteínas son complejos formados por las proteínas de membrana SNAP-25 y sintaxina y por la proteína vesicular VAMP (sinaptobrevina). Además, existe otra proteína, la sinaptotagmina, que actúa como un sensor de Ca^{2+} para que tenga lugar la exocitosis [54], por lo que la interacción de estas proteínas SNARE con los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje es lo que media un fino acoplamiento entre la entrada de Ca^{2+} y la exocitosis del “pool” de vesículas de liberación rápida (RRP) [55].

Antes de que tenga lugar la exocitosis mediada por las proteínas SNARE, se debe dar el cebado y el anclaje de los gránulos de secreción. Este cebado (*priming*) estaría mediado por variaciones de ATP y ADP (**figura 6**). Se ha descrito que el ATP sería esencial para el cebado de estos gránulos antes de ser excitados, aunque también las variaciones de ADP parecían modular este proceso, implicadas en la activación de la proteína quinasa para el fosfatidilinositol-4-fosfato y en efectos sobre proteínas activadoras de la secreción dependientes de Ca^{2+} [56]. Por otra parte, existen evidencias que demuestran que la acidificación intravesicular por la ATPasa de protones tipo V (*V-ATPasa H⁺*) podría estar implicada de alguna manera en el proceso de cebado de los gránulos. Mientras que las vesículas que estaban listas para ser liberadas son capaces de ser excitadas, la inhibición de la acidificación de los gránulos podría impedir el relleno de los RRP y por lo tanto la exocitosis de dichas vesículas [57].

Por lo tanto, cambios en el cociente ATP/ADP generados metabólicamente modularían el tamaño de los RRP, regulando etapas entre el anclaje de las vesículas a la membrana plasmática y el cebado de los gránulos necesarios para la liberación de insulina [14] (**figura 6**).

Cuando ya ha tenido lugar la exocitosis de las vesículas y por tanto, la secreción de la insulina, se lleva cabo el proceso de endocitosis de la membrana de dichas vesículas, que son

reabsorbidas por la célula. Se han descrito tres tipos de endocitosis que se podrían dar después del proceso exocitótico: la endocitosis "kiss-and-run", donde el contenido de los gránulos es liberado a través de un poro de fusión que es abierto reversible y transitoriamente durante el proceso de exocitosis; la endocitosis de *fusión completa*, en la que la membrana de los gránulos está integrada en la membrana completa y la membrana extra es recapturada a continuación por un proceso endocitótico mediado por clatrina; la endocitosis de *semifusión*, donde se establece una apertura entre el lumen del gránulo y el espacio extracelular, conservándose la estructura de dicho gránulo [58].



Figura 6. Mecanismo de exocitosis de insulina. El anclaje/fusión, cebado ("priming") (mediado por variaciones en el cociente ATP/ADP) y la liberación (mediada por Ca^{2+} y proteínas SNARE) del "pool" de vesículas de liberación rápida (RRP) determinarían la fase de iniciación de la respuesta (1ª fase de secreción de insulina). El "pool" de vesículas de reserva y su movilización (mediada por ATP, cAMP, proteínas de unión a GTP, etc.) hacia la membrana daría lugar a la fase de amplificación (2ª fase de secreción de insulina).

4. MECANISMOS DE COMUNICACIÓN INTERCELULAR

Desde hace millones de años, los sistemas multicelulares han estado implicados en el desarrollo de mecanismos de comunicación célula-célula tanto de tipo eléctrico como de tipo químico, donde las células individuales eran sensibles a la actividad de células adyacentes a ellas y que con el tiempo fueron evolucionando a complejos que estaban regulados por señales que difundían entre ellas [59]. Así, en los mamíferos, la mayoría de las funciones endocrinas vitales son ahora dependientes de una funcionalidad propia de organismos multicelulares, donde existe un sistema de señales que se inicia presumiblemente por la difusión a través de la membrana celular de pequeñas señales moleculares mediante varios mecanismos

de comunicación (dependientes de moléculas de adhesión, integrinas, receptores, neurotransmisores, hormonas, iones, nucleótidos, etc.) [60, 61].

Se ha publicado que las proteínas transmembrana que podrían estar implicadas en este sistema de comunicación podrían ser de tres tipos. *Conexinas*, consistentes en 4 dominios transmembrana unidos a dos “*loops*” extracelulares (con tres residuos de cisteína bastante conservados) y a uno intracelular y donde el dominio C-terminal y el N-terminal se encuentran orientados hacia el citoplasma [62]. *Inexinas*, con una estructura similar a las conexinas, salvo en la secuencia primaria de aminoácidos y sólo dos residuos de cisteína en los “*loops*” extracelulares [63]. *Panexinas*, similares a las inexinas, pero con una secuencia sensible a glicosilación en uno de los “*loop*” extracelular [64].

En varios estudios ha sido establecido que las conexinas pueden oligomerizar en forma de hexámero formando lo que se ha denominado conexona, que podría acoplarse a otra célula adyacente y permitir el paso de múltiples tipos de moléculas citosólicas [62]. En el caso de las inexinas, también podrían oligomerizar para formar canales intercelulares [65], mientras que las panexinas, aunque sí oligomerizarían para dar panexonas, usualmente no formarían estos canales, probablemente por la glicosilación del residuo situado en el “*loop*” extracelular [66]. Sin embargo, la formación de los hexámeros en los tres tipos podrían permitir la entrada y salida de moléculas citosólicas (sobre todo iones, aminoácidos y nucleótidos de adenina) al medio extracelular, que podría ser esencial para la funcionalidad de las células [67].

Además, la expresión de estas proteínas sería fundamental para la mayoría de los tipos celulares, ya que han sido encontradas diversas mutaciones y polimorfismos (al menos en cuanto a las conexinas) en los genes que codifican para dichas proteínas que estarían asociadas a ciertas patologías [68].

4.1. *Conexinas, conexonas (“hemicanales”) y “gap junctions”*

Las conexinas son una familia de proteínas que forman una serie de canales intercelulares permeoselectivos agrupados en dominios de membrana denominados “*gap junctions*”, que median la difusión y el intercambio de iones y moléculas citosólicas entre células adyacentes, importante para el acoplamiento iónico y metabólico, respectivamente [69]. Estas proteínas podrían desempeñar además otras funciones no requeridas en la comunicación célula-célula e implicadas en la formación de “hemicanales” (conexonas) fuera de los dominios “*gap junctions*”, en la regulación específica de expresión de determinados genes y/o en la interacción con otras proteínas tanto citosólicas como de membrana [70].

[73]. Estas modificaciones están a menudo asociadas a cambios en la conductancia y permeabilidad de los canales formados variando de forma dependiente de isoforma. Además, estos cambios podrían afectar al ensamblaje, degradación proteolítica y biosíntesis de las conexinas [74]. Por lo tanto, la fosforilación de estas proteínas podría contribuir a la regulación de su vida media, la cual se ha demostrado que es bastante corta comparada con la de otras proteínas integrales de membrana [71].

- CONEXONAS (“HEMICANALES”):

Durante el tráfico a través del retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, seis unidades de conexinas oligomerizan alrededor de un espacio hidrofílico para formar una estructura tubular llamada conexona, de un modo que parece ser específico de isoforma. Estos hexámeros de conexinas pueden ser homoméricos (formados por un solo tipo de conexina) o heteroméricos (formados por varios tipos de conexinas) [75]. Una vez constituidos estos hexámeros, serían transportados hacia la membrana plasmática de la célula mediante vesículas derivadas del aparato de Golgi a través de los microtúbulos, aunque se ha descrito que podría ser también por fusión del retículo endoplasmático con la membrana plasmática [76].

Cuando estos hexámeros se insertan en la membrana celular y no se anclan con los de otra célula adyacente, quedando expuestos al medio extracelular, se formarían los llamados “hemicanales” (**figura 8**) [71]. Se ha demostrado que estas estructuras podrían permitir el intercambio de moléculas citosólicas con el medio extracelular, sobre todo aminoácidos, iones y nucleótidos de adenina (ATP y ADP) (**figura 8**), así como la captación de marcadores impermeables a la membrana [77]. Este flujo de moléculas ha podido ser inhibido por drogas bloqueantes de estos canales, por lo que podrían ser una gran herramienta para estudiar su mecanismo [78].

Aunque hoy día, la formación de “hemicanales” funcionales de Cxs es un tema controvertido, ya que existen trabajos que indican que ha sido difícil probar claramente su funcionalidad [79], sí que ha habido evidencias de que algunas isoformas de Cxs podrían formar estas estructuras en algunos tipos celulares como los oocitos de *Xenopus Laevis* a partir de Cx46 y Cx50 [80] y otras variedades de células a partir de varias isoformas (Cx23, Cx26, Cx30, Cx32, Cx35, Cx36, Cx37, Cx45 y Cx56) [71].

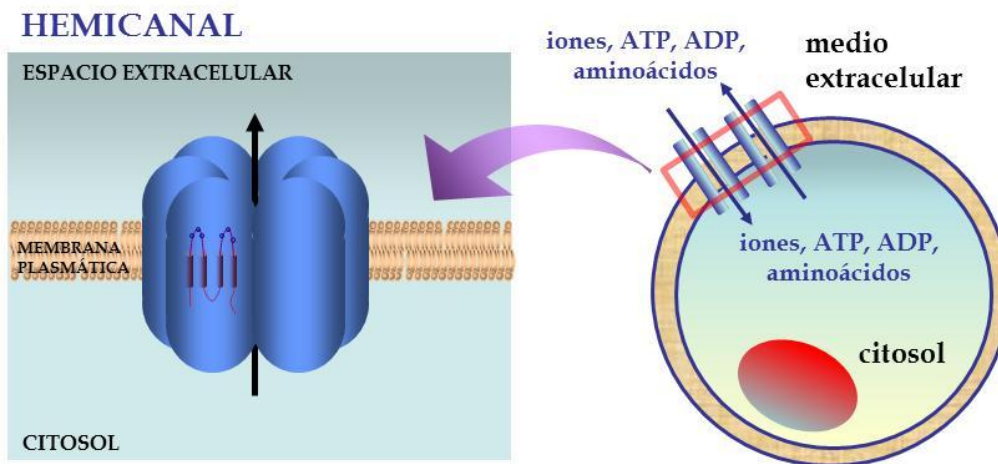


Figura 8. Representación esquemática de los “hemicanales” (conexonas) y movimiento de moléculas citosólicas a través de ellos. Oligomerización de seis unidades de conexinas (hexámero) alrededor de un espacio hidrofílico central y anclaje en la membrana citoplasmática. Cuando las conexonas se anclan a la membrana y no forman un canal intercelular con otra célula adyacente, se forman los “hemicanales”, que serían permeables a la difusión de ciertas moléculas como iones, ATP, ADP o aminoácidos.

Las propiedades biofísicas de los “hemicanales” han mostrado que además de tener una permeabilidad a ciertas moléculas citosólicas, también la tienen para ciertos colorantes como el yoduro de propidio, el *Lucifer Yellow* o la 6-carboxifluoresceína [81]. Su apertura es inducida por una depolarización de la membrana a niveles suprafisiológicos ($V > 40\text{-}60\text{mV}$) y en algunos casos además activada por concentraciones bajas de iones divalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+}) o bajo condiciones isquémicas, lo que originaría una pérdida de moléculas citosólicas [82, 83].

Por lo tanto, estas propiedades de los “hemicanales” podrían servir como herramienta de estudio para comprobar la relevancia de estas estructuras sobre las funciones celulares.

- “GAP JUNCTIONS”:

Una vez formadas las conexonas y ancladas a la membrana plasmática, cuando se produce una interacción mediada por moléculas de adhesión dependientes de Ca^{2+} con otra conexona de otra célula adyacente, se forma un canal hidrofílico intercelular que conectaría los citoplasmas de dos células y donde el espacio intercelular quedaría reducido a un hueco menor de 2-3 nm. La asociación de varias de estos canales intercelulares forman las regiones denominadas “*gap junctions*” [71] (figura 9).

Ha sido descrito que estos canales intercelulares son permeables, no sólo a iones y nucleótidos, sino también a moléculas más grandes como metabolitos, cofactores, pequeños péptidos, segundos mensajeros y hasta fragmentos de ácidos nucleicos (moléculas de hasta

1kDa de tamaño), lo que sugeriría un papel importante de estos canales en las demandas metabólicas de las células [84].

La difusión de las distintas moléculas a través de estos canales intercelulares suele ser bidireccional y controlado por gradientes electroquímicos. Además, su apertura podría estar regulada, aunque todavía no está del todo esclarecido su mecanismo [62]. No obstante, es sabido que están implicados en multitud de funciones, tales como el desarrollo embrionario, la diferenciación celular, el control de la migración y división de células adultas, la transmisión hormonal y sináptica, la sincronización mecánica y eléctrica de las células, etc. [79].

Por otra parte, también existen evidencias de la existencia de una variedad de drogas que son capaces de bloquear estos canales, la mayoría mediante la incorporación a la bicapa lipídica de la membrana para actuar desde ahí como un desacoplador químico, así como moléculas que potenciarían su funcionalidad.

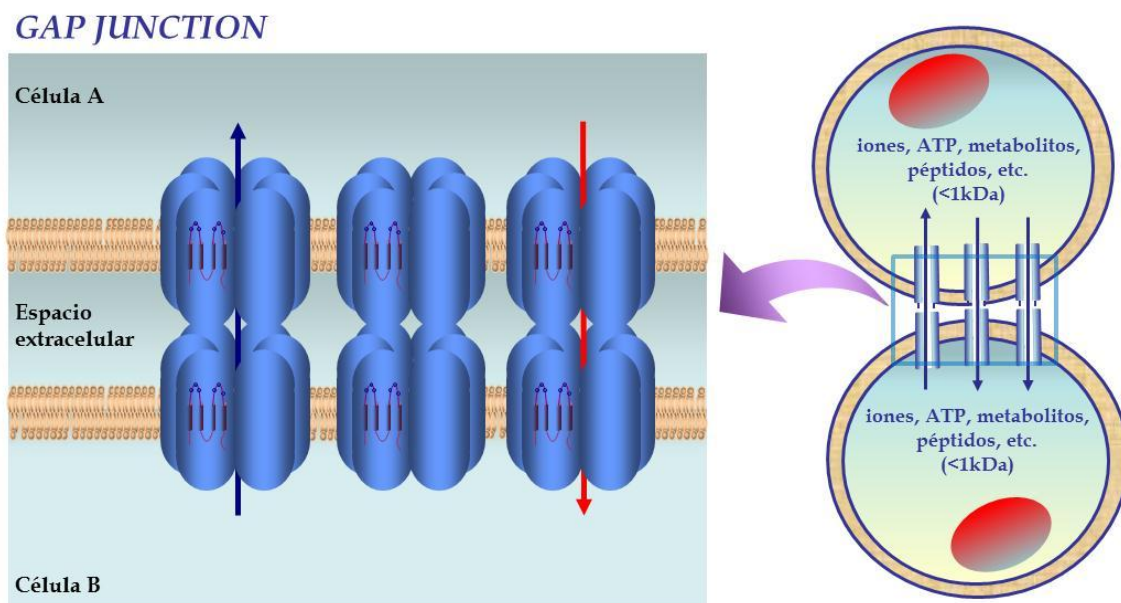


Figura 9. Representación esquemática de las regiones "gap junctions" y movimiento de moléculas citosólicas a través de los canales intercelulares. La formación de los canales intercelulares formados por la interacción de las conexonas de dos células adyacentes y la asociación de varios de ellos darían lugar a las llamadas regiones "gap junctions". Difusión de ciertas moléculas como iones, ATP, metabolitos, péptidos, etc. (moléculas con tamaño menor de 1kDa) a través de estos canales.

4.2. Comunicación intercelular en islotes pancreáticos

Está establecido que cada tipo celular que conforma los islotes de *Langerhans* tiene un papel particular en relación a la regulación de la glucemia en sangre. Sin embargo, la función de los islotes depende de la integración de las respuestas de cada tipo celular y sus interacciones y otros mecanismos de control [12].

Los islotes pancreáticos poseen un sistema de señales de coordinación inter e intracelular. Con el tiempo, este sistema ha evolucionado en una red compleja en la que las señales difunden al espacio extracelular de éstos e interactúan con cascadas de señalización que dependen de proteínas de membranas que se concentran en los contactos entre células [86]. Estos mecanismos median las comunicaciones islote-islote y célula-célula directas (dependientes de moléculas de adhesión, integrinas, receptores, etc.) e indirectas (dependientes de neurotransmisores, hormonas, iones, nucleótidos, etc.), imprescindibles para la correcta funcionalidad de las células pancreáticas [87].

Ha sido documentado en roedores y humanos que las proteínas encargadas de la mayoría de los acoplamientos celulares que tienen lugar en los islotes pancreáticos son las conexinas y que el establecimiento de las comunicaciones célula-célula sería esencial en el control de la secreción de insulina [88, 89].

En el contexto de las células β pancreáticas, diversos trabajos han identificado a la isoforma de 36 kDa (**Cx36**) como la proteína predominante que forma los "hemicanales" y los canales intercelulares que luego agrupados dan lugar a los dominios "gap junctions" [89].

4.2.1. Conexina-36. Generalidades

La Cx36 (el gen en humanos y en ratón está en los cromosomas *15q14* y *Gjd2*, respectivamente) es una proteína de 321 aminoácidos con un largo "loop" citoplasmático (99 aas) que contiene 10 residuos de glicina (Gly) y una región C-terminal que posee sitios de reconocimiento para proteínas quinasas (caseínas I y II, dependiente de cAMP y la dependiente de calmodulina), indicando que esta conexina podría estar regulada por fosforilación [71]. Además, los canales formados por Cx36 podrían estar regulados por pH, donde su actividad sería inhibida por alcalosis más que por acidosis en oocitos que expresan Cx36 [90].

Se ha descrito que la Cx36 no formaría canales con otras isoformas de Cxs (canales heterotípicos) pero sí que lo haría de manera homotípica, permitiendo un acoplamiento metabó-

lico entre las células pancreáticas demostrado por el intercambio de moléculas endógenas como metabolitos fosforilados y nucleótidos [91]. Existen además evidencias que en células neuronales y de la glía, las Cx36 podrían formar “hemicanales” funcionales por los que se podría liberar ATP al medio extracelular mediante una depolarización con una concentración de KCl 100 mM. Esta pérdida puede prevenirse por bloqueantes de conexinas como el ácido flufenámico o derivados de la quinina, pero no por bloqueantes de panexinas como la carbenoxolona. Además, la reducción de la expresión de Cx36 por siRNA (RNA silenciador) reducía la cantidad de ATP liberado durante la depolarización [83].

Además de la localización en islotes pancreáticos, la Cx36 también se expresa en neuronas del hipotálamo y la retina, donde estaría implicada en el acoplamiento neuronal y la transmisión sináptica y en células de la glándula adrenal, en las que la comunicación intercelular sería necesaria para que tenga lugar la secreción de hormonas endocrinas como las catecolaminas (norepinefrina y epinefrina) [71].

Existen evidencias de la importancia funcional de la Cx36, ya que se han identificado enfermedades genéticas (sobre todo en humanos) asociadas con mutaciones y polimorfismos de esta proteína y con patologías adquiridas en las que estaba implicada. Por ejemplo, se ha descrito que un polimorfismo simple en un nucleótido de Cx36 puede estar asociado a la epilepsia mioclónica juvenil [92] y que fenotipos de ratones KO o mutados podrían dar lugar alteraciones en la secreción de insulina, en la transmisión retinal y en el acoplamiento interneuronal en el sistema nervioso central [93].

4.2.2. *Conexina-36 y su función en la célula β . Implicación en la secreción de insulina*

La secreción de insulina y la mayoría de las funciones de los islotes pancreáticos son procesos multicelulares que permiten una rápida regulación hormonal necesaria para contrarrestar los cambios metabólicos, particularmente con respecto a la regulación de la homeostasis de la glucosa. Por lo tanto, un control metabólico apropiado implica una fina coordinación de las funciones de la mayoría de los islotes que forman el páncreas, así como de las numerosas células (sobre todo las células β) que forman dichos islotes. Además, la coordinación entre células β está implicada en una variedad de mecanismos de comunicación célula-célula tanto directa como indirectamente [88].

Como se ha comentado anteriormente, se ha identificado a la **Cx36** como la principal proteína implicada en la formación de los canales intercelulares que median la comunicación célula-célula en los islotes pancreáticos [94, 95] (**figura 10**).

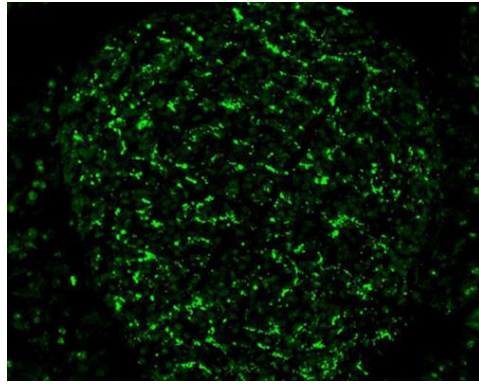


Figura 10. *Cx36 expresada en islotes pancreáticos de ratón. Detección inmunofluorescente de la Cx36 a partir del marcaje con un anticuerpo anti-Cx36 (C-terminal) policlonal de conejo. (Life Technologies cat. No. 36-4600).*

Se ha descrito desde hace tiempo que las células β pancreáticas poseen muchas características similares a las neuronas como por ejemplo, la expresión de algunas moléculas neuro-específicas como el GAD o el GLUT-2, la respuesta a glucosa, la estimulación por hormonas o su excitabilidad. Estas similitudes han sugerido la participación de los dominios “*gap junctions*” formados por Cx36 en la funcionalidad de las células β al igual que en la células neuronales [89]. Sin embargo, aunque en neuronas sí que se ha comprobado la existencia de “hemicanales” funcionales que podrían estar implicados en la liberación de ATP y aminoácidos como el glutamato, no hay evidencia de que la Cx36 forme estos “hemicanales” en células β [96], aunque en este tema son escasos los trabajos publicados que puedan dilucidar la existencia o no de este tipo de comunicación entre el interior y el exterior celular y su implicación en el mecanismo de secreción de insulina.

Diversos estudios han documentado que células β aisladas poseen una liberación de insulina basal incrementada, una pobre o nula respuesta a glucosa, una expresión basal disminuida del gen de la insulina y una biosíntesis de pro-insulina también disminuida. El restablecimiento de los contactos entre células recuperaba parcialmente estas funciones [98, 99]. Similares conclusiones se observaron en islotes aislados expuestos a drogas bloqueantes de los canales formados por Cxs, los cuales volvieron a mostrar una alteración en la secreción de insulina inducida por glucosa que fue recuperada rápidamente después del lavado de la droga [100] (**figura 11**).

En un estudio realizado sobre ratones transgénicos *knock out* para el gen de la Cx36 [97], señalan que los islotes pancreáticos eran totalmente normales, pero sin embargo se caracterizaban por su carencia de “*gap junctions*” en las células β . Estas células no mostraban una sincronización intercelular normal del Ca^{2+} intracelular propia de la estimulación por glucosa en

las células β que expresan la Cx36. Así, los islotes carentes de esta proteína tenían defectos en la liberación de insulina estimulada por glucosa y mostraban una liberación basal de insulina incrementada. Esta excesiva secreción basal de insulina la argumentaban por el hecho de que estas células desacopladas no podían ser inhibidas por células adyacentes mediante corrientes inhibitorias, evento que sí es observado en células acopladas de ratones control [101]. Sin embargo, en un trabajo más reciente se observa que esta secreción basal de insulina es similar en islotes de ratones KO-Cx36 y los ratones control [102], lo que podría sugerir futuros experimentos que pudieran aclarar esta controversia.

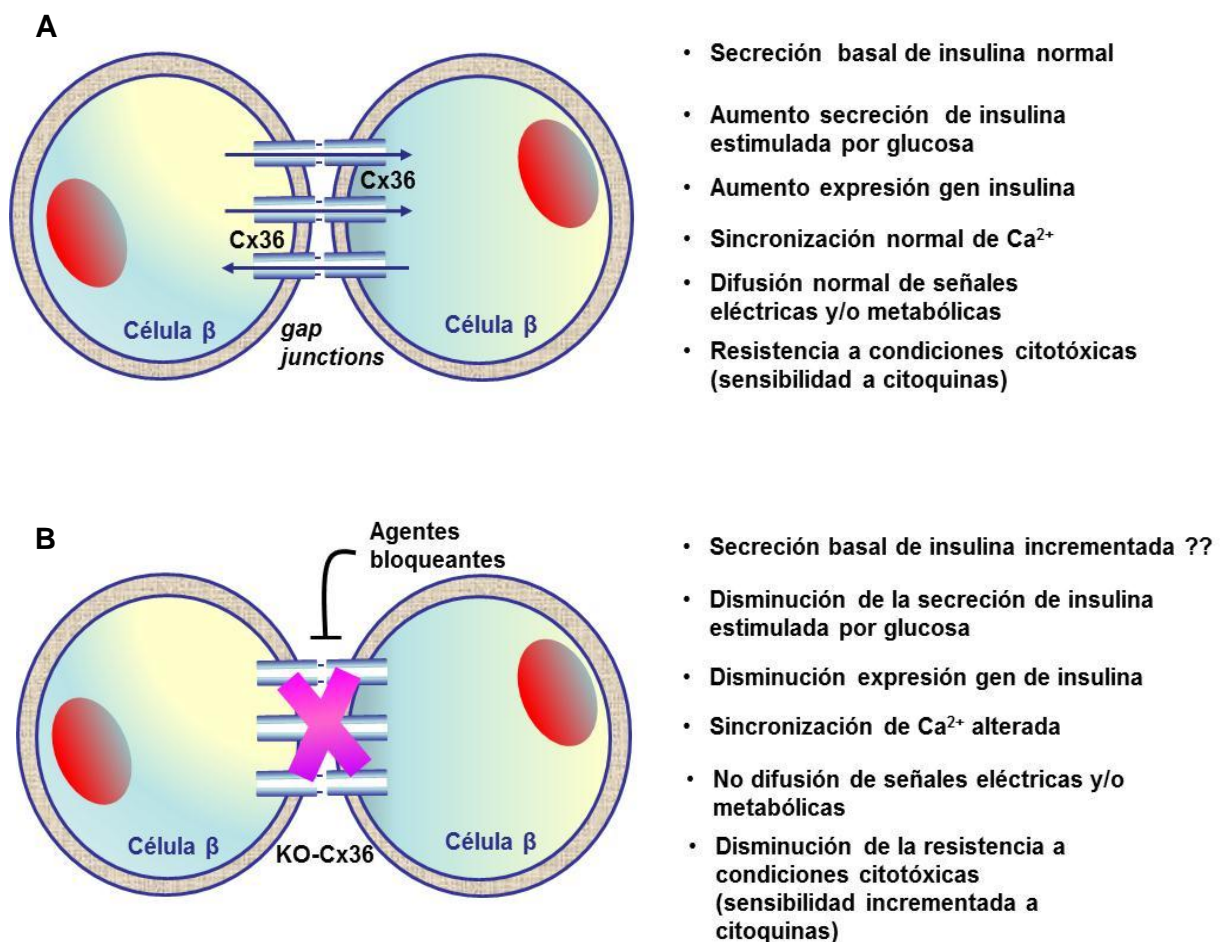


Figura 11. Efecto de la Cx36 en la funcionalidad de las células β pancreáticas. (A) Propiedades de las células β cuando existe un acoplamiento dependiente de Cx36. (B) La delección de la Cx36 o el bloqueo de los canales intercelulares conlleva alteraciones en la expresión y secreción de insulina, en la sincronización del Ca^{2+} , en la difusión de señales y una disminución en la resistencia a condiciones citotóxicas, incluyendo la posible exposición de citoquinas diabéticas.

También se ha demostrado que un tipo de línea celular tumoral secretora de insulina (células MIN6, similares a las células β pancreáticas) expresan espontáneamente la Cx36. En un ensayo de transfección con un RNA antisentido de la Cx36, se inhibió la expresión de la pro-

teína y se produjo una disminución de la respuesta a glucosa y a otros segretagogos, sugiriendo un papel importante de la Cx36 en la modulación de la respuesta secretora. Además, en ensayos de oscilación del Ca^{2+} citosólico se demuestra que la Cx36 no es necesaria para la generación del Ca^{2+} en células individuales, pero sin embargo sí que es requerida para la sincronización de estas oscilaciones a través de toda la población de células β [103].

Por lo tanto, estos datos indicarían que las “*gap junctions*” formadas por estas conexinas podrían jugar un papel esencial en los mecanismos de control del acoplamiento entre el estímulo y la secreción inducida por glucosa y que la expresión de la Cx36 y la formación de los canales intercelulares debería ser un prerrequisito para una secreción óptima de insulina.

Además de la importancia de esta proteína en la modulación de la secreción de insulina, recientes observaciones han identificado señales dependientes de Cx36 que estarían implicadas en la protección de las células β contra diversos daños, como la apoptosis inducida por citoquinas en el comienzo de la autoinmunidad de los islotes propia de la diabetes tipo 1 [104]. Esto podría sugerir que la Cx36 podría además contribuir a la regulación de la masa celular, ya que se ha visto que el acoplamiento entre células está aumentado en periodos prenatales, condición asociada a un incremento en la proliferación celular y una reducción en la apoptosis [105].

4.2.3. Conexina-36. Patologías y perspectivas en la Diabetes Mellitus

Como se ha comentado anteriormente, se ha atribuido un papel importante a la Cx36 en la función de la célula β , aumentando las posibilidades de que alteraciones en esta proteína y por lo tanto en la comunicación intercelular, pudieran estar implicadas en la patogénesis de las disfunciones que dan lugar a la diabetes [88]. Datos experimentales en roedores han indicado una plausible participación de la Cx36 tanto en diabetes tipo I como tipo II.

Está descrito que la Diabetes Mellitus tipo I es una enfermedad autoinmune directamente sobre las células β y que resulta en un incremento desmedido de los niveles de citoquinas pro-inflamatorias en el entorno de los islotes pancreáticos. Existen experimentos *in vitro* e *in vivo* que han comprobado que la Cx36 podría tener un efecto protector sobre las células β expuestas a drogas como la estreptozotocina o a citoquinas como la interleucina-1 β (IL1 β), que experimentalmente reproducen *in vitro* la muerte celular masiva observada en este tipo de diabetes. Mientras que ratones transgénicos con una sobre-expresión de la Cx36 estaban protegidos frente a los efectos citotóxicos de la estreptozotocina, los ratones que carecían de la conexina eran sensibles a los efectos de la droga y desarrollaban una rápida hiperglucemia

debida a la pérdida de masa celular [106]. Los mecanismos de esta protección dependerían por tanto de los contactos entre células, que no sería debido a la pérdida de actividad de las citoquinas pro-apoptóticas y que, al menos *in vitro*, protegerían a las células β de estos factores endógenos. Además, se ha comprobado que la interleuquina-1 β , el interferón- γ y el factor- α de necrosis tumoral disminuyen la expresión de la Cx36 [104] y que cambios en esta expresión a nivel de la transcripción del gen habrían sido detectados en el genoma de modelos de este tipo de diabetes [107].

Está reconocido que la Diabetes Mellitus tipo II es un desorden hereditario con un alto componente poligénico y que en humanos existen fenotipos propios de esta patología con varios "locus", entre los que está el cromosoma 15q14, donde se encuentra el gen que codifica para la Cx36 (86). Incluso un polimorfismo en la secuencia codificante de este gen podría afectar a la vida media y a la función de la Cx36, resultando posiblemente en una pérdida de función celular en los pacientes con este tipo de diabetes [88]. Estudios en modelos animales han mostrado que una pérdida de Cx36 podría estar asociada con una disminución de la secreción de insulina a concentraciones de glucosa post-prandiales y con una secreción basal incrementada, que son defectos secretores similares a los observados en este tipo de diabetes. Además, en un trabajo publicado recientemente se ha demostrado que en ratones pre-diabéticos (con una resistencia periférica a la insulina, una moderada hiperglucemia, una hiperinsulinemia y un incremento compensatorio en la masa del páncreas endocrino) la secreción de insulina inducida por glucosa era significativamente menor y tenían un acoplamiento intercelular un 30% más bajo con respecto a los ratones control, como reveló la inyección de bromuro de etidio en islotes aislados [108].

Uno de los objetivos primordiales para el entendimiento de la fisiología de las células β es el desarrollo de estrategias dirigidas al tratamiento de la diabetes. Una de las terapias más prometedoras en los últimos años ha sido el trasplante de células productoras de insulina que mantienen las características esenciales de las células primarias, incluido un normal acoplamiento estímulo-secreción en la liberación de insulina estimulado por glucosa, como son las células embrionarias de ratón, que se diferencian más fácilmente hacia el fenotipo típico de las células β después del ensamblaje en estructuras similares a los islotes [109].

Se ha demostrado que exposiciones crónicas a concentraciones elevadas de glucosa podrían afectar negativamente a la expresión de la Cx36 en líneas celulares productoras de insulina a nivel transcripcional y mediado por elementos de respuesta a cAMP altamente conservados [106]. Por lo tanto, si este mismo efecto sucediera en islotes pancreáticos de huma-

nos expuestos a largos periodos de tiempo hiperglucémicos, una posible terapia podría ser intentar restaurar los niveles de esta proteína. Por ejemplo, se ha demostrado que drogas antidiabetogénicas, como son las sulfonilureas, podrían promover el ensamblaje de los canales intercelulares formados por este tipo de conexinas y favorecer el acoplamiento celular [110].

También hoy día existen experimentos dirigidos a la búsqueda de dianas farmacológicas sobre las Cx36 (77), como las drogas denominadas antimaláricas, como los derivados de la quinina (por ejemplo la *Mefloquina*) que podrían inhibir selectivamente a la Cx36 y que por lo tanto podría ser usada como herramienta para entender el papel funcional de la Cx36 [111].

Con respecto al mecanismo molecular por el que la Cx36 afecta a la función celular, se debería indicar que muchos de los iones y metabolitos que fluyen por los “hemicanales” formados por las Cx-36, son además importantes señales para la secreción de insulina y por tanto con un posible papel de segundo mensajero. Sin embargo, está todavía por demostrar si alguna de estas moléculas podría ser un nexo entre las Cx36 y los cambios en la secreción de insulina. En cambio, con respecto al mecanismo celular que se ve afectado por las señales dependientes de Cx36, se necesitaría investigar sobre cómo y cuáles son las subpoblaciones de células β que están implicadas en la secreción insulínica [87]. Por lo tanto, los estudios destinados a investigar estos mecanismos moleculares por los que la Cx36 está implicada en alteraciones en la secreción de insulina podrían servir de base para los siguientes pasos en el tratamiento de la diabetes.

Otra perspectiva de futuro sería poder determinar las alteraciones tanto cualitativas como cuantitativas en los genes que codifican para las Cxs en humanos, que podrían estar implicadas en la patogénesis de la diabetes tipo I y II y si están asociadas a los defectos que caracterizan estas enfermedades, como se indica en estudios con animales [87].

A pesar de todos los datos demostrados acerca de la implicación de las Cx36 en la función de las células β , todavía quedan en el aire algunas cuestiones que tienen que ver con la organización molecular de estas rutas de coordinación intercelular (rutas dependientes de las conexinas), así como su implicación en la patofisiología del páncreas endocrino. Por lo tanto, el entendimiento de estos mecanismos podría ser en un futuro una gran herramienta para el desarrollo de terapias novedosas para el tratamiento de pacientes diabéticos y la Cx36 como una posible diana terapéutica para esta enfermedad.

OBJETIVOS

Con el fin de estudiar la importancia de los “hemicanales” formados por conexinas en la secreción de insulina en islotes pancreáticos, así como de profundizar en el estudio del mecanismo de la respuesta secretora, se propusieron los siguientes objetivos:

1. Caracterización funcional de “hemicanales” en islotes pancreáticos y en células aisladas mediante el estudio del flujo de nucleótidos de adenina (ATP y ADP) y aminoácidos en condiciones depolarizantes y su efecto sobre la secreción de insulina. Efecto de la glucosa y análogos no metabolizables así como de inhibidores de conexinas.
2. Estudio del mecanismo de acoplamiento entre la generación intracelular de ATP y la secreción de insulina, mediante el modelo experimental de islotes “*permeabilizados*” por depolarización. Efecto de concentraciones variables de ATP extracelular y de metabolitos glucolíticos o mitocondriales sobre la respuesta secretora.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. AISLAMIENTO DE ISLOTES PANCREÁTICOS

Los modelos animales que se han empleado para el desarrollo de los experimentos diseñados han sido: rata *Wistar* macho (*Harlan-Animal Research Laboratory*) y ratones de la cepa *C57BL6J* (*Jackson Laboratory*). Los animales se sacrifican por decapitación y una vez extraído el páncreas, es troceado y dividido en dos fracciones de 1 ml o 0.5 ml (para rata o ratón, respectivamente), diluyendo cada fracción en 4 ml (ratones *C57BL6J*) o 5 ml (ratas *Wistar*) con solución Hanks (NaCl 137 mM, KCl 5.36 mM, Na₂HPO₄·H₂O 0.34 mM, KH₂PO₄ 0.44 mM, MgSO₄ 0.81 mM, glucosa 3 mM, CaCl₂·2H₂O 1.26 mM) ajustado a pH=7.35 con NaHCO₃ al 8,4%. A continuación, se procede a la digestión del páncreas con colagenasa P (*Roche Diagnostics S.L.*).

Condiciones de digestión:

- Páncreas ratas *Wistar*: agitación durante 3 minutos a 37°C con 2 mg/ml de colagenasa (concentración que varía dependiendo de la actividad específica (1.8 U/mg lisozima) del lote de colagenasa usado).
- Páncreas ratones *C57BL6J*: agitación durante 5 minutos a 37°C con 4 mg/ml de colagenasa.

Seguidamente se mezclan las fracciones, y tras varios lavados, se aíslan los islotes mediante una pipeta capilar bajo microscopio (*Zeiss, Germany*), depositándolos en una placa Petri que contiene solución KRBH [Krebs-Ringer (NaCl 115 mM, KCl 4.7 mM, CaCl₂·2H₂O 2.56 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM y MgSO₄ 1.2 mM), tamponado con NaHCO₃ 0.5 mM y Hepes 20mM y suplementado con albúmina (BSA libre de ácidos grasos) al 0.5%].

Así, se obtienen los islotes libres de tejido exocrino pancreático y totalmente funcionales, con los que se llevan a cabo los experimentos.

2. SECRECIÓN DE INSULINA

2.1. *Perifusión de islotes pancreáticos*

Con el sistema de perifusión (**figura 12**) empleado para realizar estos experimentos se puede medir la secreción de insulina cada minuto de 4 grupos de 40 islotes simultáneamente. Para ello, cada uno de estos grupos se perfunden en paralelo con un flujo de medio de 0.5

ml/min aspirado por una bomba peristáltica (*MINIPLUS 3, Gilson*). Todo el sistema se encuentra sumergido en un baño de agua a 37°C.

La pauta que se ha seguido es similar en todos los experimentos: después de una pre-perifusión durante 45 minutos con KRBH suplementado con BSA 0.5% bajo condiciones basales (en ausencia de sustratos o con concentraciones no estimuladoras de éstos, glucosa 5 mM), de los cuales se recogen sólo los últimos 15 minutos con 4 colectores de fracciones (*2112 Redifrac y Pharmacia-Redifrac, LKB*), se estimulan los islotes durante 30 minutos con KRBH con la/s sustancia/s cuyo efecto sobre la secreción se quiere comprobar (recogiendo las fracciones de toda esta media hora). Finalmente, se cambia el medio de perifusión a las condiciones basales iniciales durante 25 minutos para permitir la vuelta a la situación basal de la secreción de insulina de los islotes y se colecta el medio hasta el final del experimento. De cada una de estas fracciones de 0.5 ml se pipetea 50 µl en otros tubos y se guardan -20°C para su posterior cuantificación de la concentración de insulina por radioinmunoensayo.

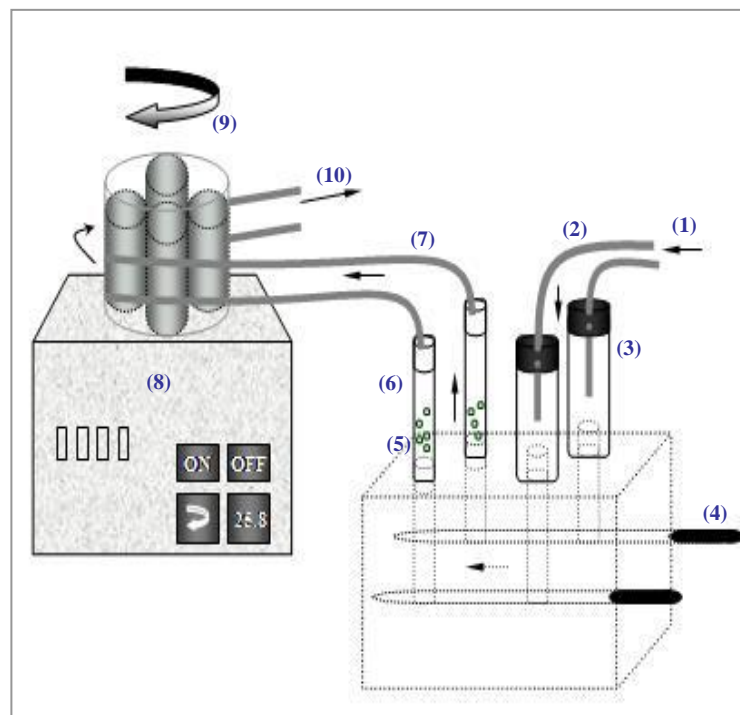


Figura 12. Sistema de perifusión. (1) Entrada del medio proveniente de los recipientes que contienen las distintas soluciones que se cambiarán por medio de válvulas de cuatro vías. (2) Tubo capilar de polietileno. (3) Cámara "capta-burbujas" que evitan que entren burbujas en la cámara donde se alojan los islotes. (4) Tapón de plástico que evita que salga el medio al exterior. (5) Islotes pancreáticos. (6) Cámara de perifusión sellada por ambos extremos con filtros de nylon. (7) Catéter de tygon. (8) Bomba peristáltica. (9) Dirección de giro de los rodillos de la bomba. (10) Salida del medio hacia los distintos colectores de fracciones.

2.2. Medida de la concentración de insulina

Para medir la concentración de insulina de las muestras que se han obtenido en la mayoría de los experimentos realizados se ha usado la técnica del **RADIOINMUNOENSAYO** (RIA). No obstante, parte de los resultados expuestos en este trabajo han sido medidos mediante la técnica de “*fluorescencia por transferencia de energía de resonancia*”, denominada “**FRET**” (“*Fluorescence Resonance Energy Transfer*”).

2.2.1. RADIOINMUNOENSAYO

La técnica del radioinmunoensayo [112] se basa en la competencia que se establece, para unirse a anticuerpos específicos, entre la sustancia a cuantificar y cantidades conocidas de la misma sustancia marcada con un isótopo. Al establecerse esta competición resulta que a mayor cantidad de sustancia a cuantificar, menor será la cantidad de la sustancia radiactiva que se une al anticuerpo y viceversa.

En cuanto a la medida del contenido de insulina de grupos de 10 islotes, se añaden 50 μ l de etanol 77%-HCl 1% (stock al 37%) y se conservan a -20°C . Para valorar el contenido de hormona es necesario diluir estas muestras 1/1000.

MONTAJE DE LA TÉCNICA

1. Marcaje y purificación de insulina radioyodada con ^{125}I Na

A. Marcaje de la insulina con ^{125}I

En primer lugar, para realizar el marcaje de la insulina (en este caso insulina porcina usado como trazador radiactivo) se emplea la técnica de *Hunter y Greenwood* [113], basada en la oxidación del yoduro radiactivo a yodo atómico por la cloramina T, el cual se introduce en uno de los carbonos del anillo bencénico de alguno de los cuatro residuos de tirosina de la cadena A (residuos 14 y 19) o B (residuos 16 y 26) de la molécula de insulina. La acción oxidante de la cloramina T se detiene al cabo de 30 segundos mediante la adición de metabisulfito sódico y yoduro potásico frío.

Metodología

Para preparar la “mezcla de radioyodación”, se añaden en un tubo, por orden, las siguientes soluciones:

1. 25 μl de Tampón fosfato 0.5 M, pH=7.5 (obtenido por combinación de Na_2HPO_4 0.5 M y KH_2PO_4 0.5 M, hasta pH=7.5).
2. 5 μl de insulina porcina 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (I5523-Sigma-Aldrich Química S.A) en HCl 0.03 N.
3. 10 μl de cloramina T trihidrato (102426-Merck) (en tampón fosfato 0.05 M pH=7.5).
4. 10 μl de preparación comercial de ^{125}I Na (1mCi/10 μl) (Perkin-Elmer).
Se agita la mezcla durante 30 segundos y a continuación se añade:
5. 50 μl de metabisulfito sódico (6528-Merck) (24 mg disueltos en 10 ml de tampón fosfato 0.05 M).
6. 100 μl de yoduro potásico 1% (5040-Merck) (en tampón fosfato 0.05 M).
7. 100 μl de albúmina bovina (10775835001-Roche) al 20% (en tampón glicina 0.2 M pH=8.8).

Para comprobar el porcentaje de incorporación del isótopo ^{125}I a la insulina en el proceso de radioyodación, se utiliza la propiedad del ácido tricloroacético (TCA) de precipitar las proteínas. Para ello se diluyen 5 μl de la mezcla de radioyodación con 5 ml de tampón glicina 0.2 M y se ajusta la radiactividad a 30000-50000 cpm (cuentas por minuto) (*contador gamma Wizar 1470 Automatic Gamma Counter; Perkin-Elmer*) en un volumen de 0.1 ml. Se pipetea en triplicado 0.1 ml en otros tubos, se les añade 100 μl de solución BSA 10% y 0.8 ml de tampón glicina 0.2 M. Se mezcla y se añade 1ml de TCA al 20%. Se guarda la mezcla durante 15 minutos a 4°C y, a continuación, se centrifugan a 3000 rpm durante 10 minutos y se aspira el sobrenadante. Finalmente, se mide la radiactividad del precipitado. Así, comparando la emisión radiactiva del precipitado con la radiactividad total, se calcula el porcentaje de incorporación del ^{125}I a la insulina:

$$\% \text{ de incorporación} = \frac{\text{cpm del precipitado} \times 100}{\text{cpm totales}}$$

Además, también se podría calcular la actividad específica de la nueva hormona marcada:

$$\text{Actividad específica} = \frac{\% \text{ incorporación} \times ^{125}\text{I}}{\mu\text{g insulina}}$$

B. Purificación de la insulina radioyodada

La purificación de la insulina porcina ya marcada se lleva a cabo mediante cromatografía de filtración en gel (*Cat. 150-4144 Bio-Gel P-10 de Bio-Rad*, con un diámetro de partícula 45-90 μm en húmedo y un límite de exclusión de 20 kDa), previamente hidratado con tampón glicina 0.2 M pH 8.8 y desgasificado mediante vacío durante unas doce horas.

Antes de cargar la mezcla de radioyodación en la columna de cromatografía, se pasa una alícuota de 0.2 ml de BSA al 20% para evitar la adsorción de la hormona marcada a las paredes de dicha columna.

En primer lugar, se monta el Bio-Gel en una columna de cromatografía de 1.5 cm de diámetro por 30 cm de altura y después de estabilizarse con tampón glicina 0.2 M, se transfiere la mezcla con la insulina marcada a la columna y se eluye con este mismo tampón con la ayuda de una bomba peristáltica (*LKB, Bromma, 2115 Multiperpex*). A continuación, se van recogiendo fracciones de 1 ml (17 gotas) en un colector (*LKB, modelo 7000 Ultrarac*) y se cuenta la radiactividad de cada tubo en un contador *BIOSCAN/QC 2000*. Seguidamente, se van seleccionando las fracciones que contienen la insulina inmunológicamente activa (fracciones 21-26), que se empleará como radiotrazador y se les añade 0.1 ml de BSA al 20%. De estas fracciones se vuelve a contar la radiactividad de alícuotas de 5 μl en un contador gamma y se selecciona un volumen determinado de una de ellas para un determinado experimento a realizar.

Como es necesario purificar la hormona cada vez que se lleve a cabo un radioinmunoensayo, las fracciones inmunológicamente activas seleccionadas en el proceso de purificación anterior, se conservan a -20°C para su posterior uso. Para la purificación de insulina marcada de estas fracciones se procede del mismo modo que en el proceso anteriormente descrito, cargando en la columna un volumen determinado dependiendo de las muestras a valorar en cada experimento.

Según esta técnica de separación cromatográfica empleada, primero eluye una fracción de insulina degradada, después la hormona inmunológicamente activa y finalmente una fracción que correspondería al ^{125}I no incorporado a la insulina porcina.

2. Preparación del anticuerpo frente a insulina

La dilución inicial de anticuerpo [bien el anticuerpo GP-12 anti-insulina donado por el Dr. Janove Sehlin (Departamento de Biología Celular, Universidad de Umea, Suecia), bien el

anticuerpo GP-38 anti-insulina proporcionado por la Dra. Marisa Villanueva-Peñacarrillo (Fundación Jiménez Díaz, Madrid)] de la que se parte es de 1/100 (solución stock almacenada a -20°C). Dado que el volumen de solución de anticuerpo añadido en cada tubo de radioinmunoensayo es de 0.2 ml y el volumen total de incubación es de 0.5 ml (se diluye 2.5 veces), se prepara una dilución 2.5 veces más concentrada que la deseada en la mezcla final. Así, para el anticuerpo GP-12 se usó una dilución final de 1/400000, por lo que la dilución que preparamos es de 1/160000 y para el GP-38 se preparó a 1/40000 ya que se requería una dilución final de 1/100000.

Por lo tanto, el volumen total a preparar (en tampón glicina 0.2 M pH 8.8 suplementado con BSA 0.25%) para cada ensayo es igual al número de muestras multiplicado por 0.2 ml.

3. Preparación de la solución con la ^{125}I -insulina

El volumen de solución de ^{125}I -insulina en tampón glicina 0.2 M pH 8.8 y BSA 0.25% vendrá determinado por el número de muestras de cada experimento, ya que a cada muestra se le añade 0.25 ml. La radiactividad (cuentas por minuto, cpm) variará según la actividad específica de la hormona radioyodada, normalmente alrededor de 10000 cpm. Así, para conseguir esa emisión radiactiva será necesario añadir tanta insulina marcada purificada como sea necesario para conseguir una actividad total de 40000 cpm/ml en el volumen total preparado para cada radioinmunoensayo determinado.

4. Preparación de la curva estándar de insulina

Para preparar la curva estándar de insulina partimos de una serie de concentraciones conocidas de **insulina de rata** (8013-K Linco Research, Inc) en **unidades ng/ml: 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5 y 10**, que se harán reaccionar con el anticuerpo en presencia de una cantidad constante de la ^{125}I -insulina. Así, nos permitirá calcular la relación entre la insulina marcada que está ligada al anticuerpo y la insulina fría total presente en las muestras que se vayan a analizar.

De estas soluciones con estas concentraciones de insulina conocida se pipetea 50 μl por triplicado y 50 μl de tampón glicina 0.2 M pH 8.8 y BSA 0.25% considerado el cero (0 ng/ml). Además, se prepara un triplicado de 0.25 ml de la solución con ^{125}I -insulina (actividad total, AT), que nos indicará la cantidad real de insulina marcada que se ha añadido a cada tubo, así como un triplicado de 0.25 ml de tampón glicina más 0.25 ml de ^{125}I -insulina (blanco), que servirán para medir la eficacia del método de separación.

5. Preparación de las muestras

La preparación de las muestras para el radioinmunoensayo se realiza de la siguiente manera:

- 1°. 50 µl muestra / estándar de insulina / blanco.
- 2°. 0.2 ml de la solución con el anticuerpo.
- 3°. 0.25 ml de la solución con la ¹²⁵I-insulina.
- 4°. INCUBACIÓN A 4°C DURANTE 48 HORAS.

6. Separación de la insulina libre de la ligada al anticuerpo

Para este paso se utiliza una mezcla entre carbón activo (*CHARCOAL activado, 05120-Fluka*) y Dextrano-70 (*31390-Sigma*), para la adsorción de la insulina libre dejando en solución el complejo formado por el antígeno-anticuerpo. Se prepara una suspensión de charcoal-dextrano (3% charcoal y 0.25% dextrano en tampón glicina 0.2 M pH 8.8) y se añade 0.25 ml a cada muestra, salvo al triplicado con los 0.25 ml de solución ¹²⁵I-insulina (actividad total, AT).

Se dejan todas las muestras a 4°C durante 45 minutos y se centrifugan a 3000 rpm durante 10 minutos (*GP centrifuge, Beckman; 4227R centrifuge, ALC; Allegra™ 25R, Beckman Coulter*). A continuación, el sobrenadante es aspirado mediante una bomba de vacío y la radiactividad (cpm) del precipitado medida en un contador gamma *Wizar 1470 Automatic*.

7. Representación de la curva estándar y cálculo de la concentración de insulina

En primer lugar se realiza un cálculo de la curva estándar a partir de concentraciones conocidas de insulina de rata y las cpm emitidas. Mediante esta curva patrón se irán calculando las concentraciones de insulina libre de las distintas muestras (**figura 13**).

Para el cálculo de esta curva estándar se ha usado el método de ajuste logístico de 4 parámetros (versión de *Rodbard*), que consiste en una función matemática semi-empírica que corrige las limitaciones de la transformación Logit-Log, siendo uno de los métodos más usados en la representación de datos de radioinmunoensayo.

En este modelo se emplean todos los datos experimentales disponibles para la estimación de la respuesta a dosis cero (F_0) y a dosis infinita (NSF).

$$Y = \frac{A - D}{1 + (x/C)^B} + D$$

Y: variable dependiente (cpm); A: respuesta a dosis 0 (F_0); D: respuesta a dosis infinita (NSF); x: variable independiente (dosis); C: ED_{50} (valor de x que origina una respuesta que es la mitad entre A y D); B: pendiente de la curva

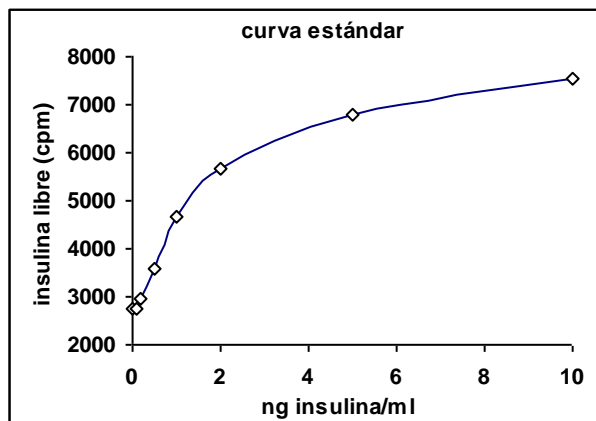


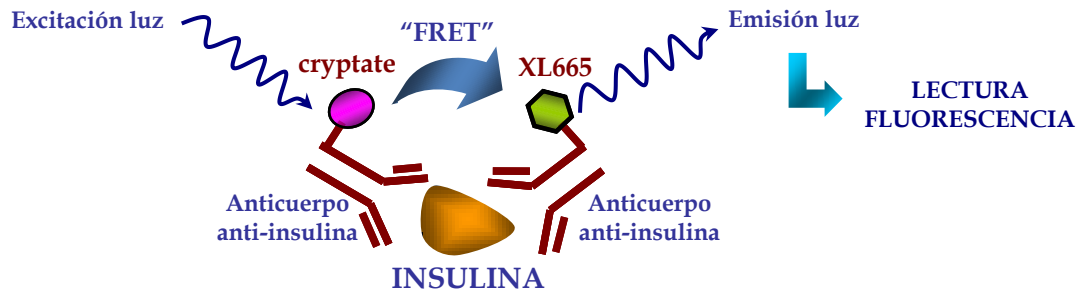
Figura 13. Curva estándar de insulina. Representación de las cpm frente a ng insulina/ml conocidas, siguiendo el ajuste realizado mediante el modelo de Rodbard y a partir de la cual se calculan las concentraciones de insulina fría de cada muestra.

En definitiva, la insulina libre es adsorbida por el charcoal-dextrano, quedando en suspensión la hormona unida al anticuerpo. Así, al centrifugar y posteriormente aspirar el sobrenadante, lo que se valora es la emisión radiactiva (cpm) de la insulina libre precipitada. Por lo tanto, sabiendo las cpm y, mediante la curva estándar calculada, se podrán calcular las concentraciones de insulina de cada muestra.

2.2.2. FLUORESCENCIA POR TRANSFERENCIA DE ENERGÍA DE RESONANCIA

La técnica FRET (“*Fluorescence Resonance Energy Transfer*”) [114] se basa en la interacción de dos estados de excitación electrónica de dos moléculas fluorescentes en la que la longitud de onda de emisión de una coincide con la de la excitación de la otra. Se produce una transferencia de energía que desemboca en la emisión de fluorescencia.

En este caso para medir la concentración de insulina el inmunoensayo consiste en el uso de una mezcla de dos anticuerpos monoclonales frente a la hormona, marcados cada uno de ellos con un fluoróforo (Eu^{3+} -cryptate y XL665, CISBIO BIOASSAYS. INSULIN ASSAY. HTRF) que reconocen distintos epítomos. Así, al unirse los anticuerpos a la hormona, ocurrirá una transferencia de energía entre estos dos fluoróforos, emitiéndose una fluorescencia que será directamente proporcional a la concentración de insulina de la muestra (ver esquema siguiente)



- 1º. 10 µl muestra / estándar de insulina (**figura 14**) / blanco.
- 2º. 10 µl de la mezcla de anticuerpos (CISBIO BIOASSAYS. INSULIN ASSAY. HTRF).
- 3º. Incubación a temperatura ambiente durante 2 horas en oscuridad.
- 4º. Medir FLUORESCENCIA (lector de microplacas, INFINITE M1000, TECAN)
(Aplicación: Tecan i-control 1.5): $\lambda_{\text{excitación}}: 317 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emisión}}: 620 \text{ nm}$

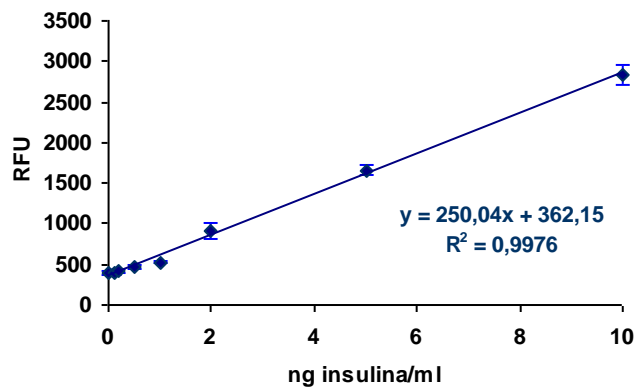


Figura 14. Recta patrón de insulina. Representación de las RFU (Unidades Relativas de Fluorescencia) frente a ng insulina/ml conocidas, realizando un ajuste lineal para obtener la pendiente y la ordenada en el origen. A partir de esta ecuación, se calcula la concentración de insulina de las muestras.

3. ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS

3.1. Incubaciones estáticas de islotes pancreáticos

Para estudiar el contenido de aminoácidos, grupos de 20 islotes se incuban durante una hora a 37°C en 70 µl de KRBH suplementado con BSA 0.5% conteniendo los compuestos determinados para cada experimento. Posteriormente, se elimina el medio, se lavan los islotes 2 veces con PBS 1X frío y se añade 30 µl de ácido sulfosalicílico al 10% (p/v) con el fin de extraer los aminoácidos, llevando las muestras finalmente a -20°C hasta que se lleve a cabo su análisis. Por otro lado, para el estudio tanto del contenido como de la liberación, son incubados grupos de 30 islotes una hora a 37°C en 70 µl del medio correspondiente. A continuación, se retiran 50 µl del sobrenadante (se congelan a -20°C), se descarta el medio restante y los

islotes se procesan de la misma forma descrita anteriormente para la medida del contenido de aminoácidos.

En otra serie de experimentos donde también se mide la liberación y el contenido aminoacídico de los islotes (en grupos de 30), se realiza una pre-incubación durante una hora a 37°C en 70 μ l de KRBH en presencia o ausencia de determinadas concentraciones de glutamina. Posteriormente, se descarta el medio, se lavan los islotes 2 veces con PBS 1X frío y se incuban otra hora en 70 μ l con las sustancias experimentales en ausencia de Gln. A partir de aquí, las muestras son procesadas del mismo modo explicado para los experimentos de medida del contenido y liberación. Del mismo modo, grupos de 25 islotes son pre-incubados en 70 μ l del medio determinado durante una hora e incubados en 25 μ l con los compuestos a probar una segunda hora. Después, se retiran 15 μ l para la medida de la liberación de aminoácidos y se añade 30 μ l del sulfosalicílico al 10% a los islotes, para la medida en este caso del contenido.

3.2. Cuantificación de aminoácidos

Regularmente se identifican y separan en los extractos 12 α -aminoácidos con una sensibilidad próxima a 1 pmol (Asp, Glu, Ser, Gln, His, Gly, Thr, Arg, Tau, Ala, Tyr y GABA; aunque en ocasiones también son cuantificados otros 3 aminoácidos como son Val, Leu e Ileu) (**figura 15**). La cuantificación se llevó a cabo mediante detección fluorescente tras derivatización con o-ftalaldialdehído (OPA) y separación cromatográfica por HPLC ("High Performance Liquid Chromatography") en fase reversa (columna C18) [115], en el laboratorio del Dr. Rafael Martín del Río (Departamento de Investigación del Hospital Ramón y Cajal, Madrid).

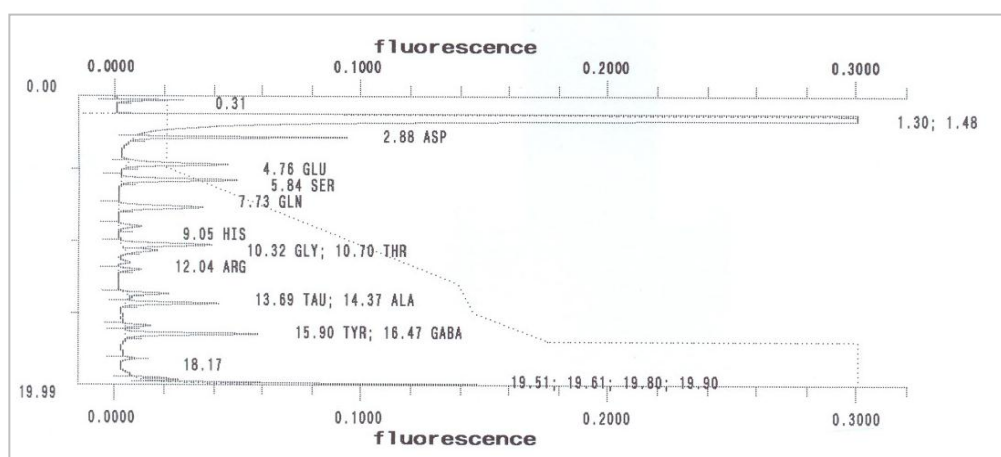


Figura 15. *Separación de aminoácidos.* Ejemplo de cromatograma obtenido en la separación de aminoácidos de una muestra estándar. Al lado de cada aminoácido está señalado su tiempo de retención.

4. VALORACIÓN DE DNA

La medida del DNA se realizó con un método fluorimétrico [116] de un extracto de 20 islotes previamente sonicados en 100 μl de H_2O milli Q (4 ciclos de 10 pulsos con intensidad mínima y con 10% de frecuencia, *Branson Sonifier 450*) pipeteando dos alícuotas de 20 μl y una de 40 μl en placas de 96 pocillos especiales para medidas fluorimétricas (*Costar, Corning Incorporated*). Se incuban a 37°C hasta evaporación.

Por otro lado se prepara una recta patrón a partir de concentraciones de DNA conocidas (DNA bovino, *D4522-Sigma*) que van desde 5×10^{-4} $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ hasta 3.2×10^{-2} $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en un volumen de 20 μl (en NaOH 5 mM).

1. Se reconstituyen las muestras con 20 μl de NaOH 5 mM y se pipetean por triplicado en la placa 20 μl de las concentraciones de DNA conocidas (considerando el blanco NaOH 5mM).
2. Se añaden 20 μl de PCA 1 M (ácido perclórico) y se incuban las muestras tapadas durante 60 minutos a 70 °C.
3. Transcurrido ese tiempo, se para la reacción en hielo y se añaden 40 μl de MEZCLA FLUORESCENTE que se prepara antes de la siguiente manera:

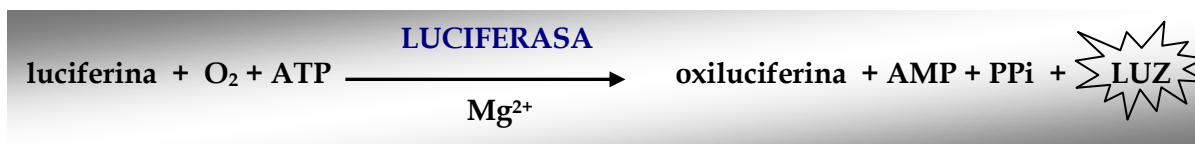
→ Se realiza una purificación del DABA (ácido diaminobenzoico, *S35171-Sigma-Aldrich*) al 20%, producto fluorescente con capacidad de unirse al DNA. Para ello se disuelven 200 mg del producto en 1 ml de H_2O milli Q y se le añade 20 mg de Charcoal (Carbón Activo, *05120-Sigma*) para eliminar impurezas. Se mezcla y a continuación se centrifuga 5 minutos a 13000 rpm (*Biofuge, Heraeus*). Se selecciona el sobrenadante y se repite la purificación 2 veces añadiendo cada vez 10 mg del Charcoal. Finalmente, la solución de DABA se hace pasar por un filtro de 0.22 μm de diámetro de poro (*Millex, Millipore*).

La *mezcla fluorescente* estará compuesta por 3 volúmenes de Na_2CO_3 10 mM (preparado en NaOH 1 M) por cada volumen de la solución de DABA purificado.

4. Se agita la placa y se incuba durante una hora a 37°C.
5. Se diluyen las muestras con 0.25 ml de HCl 1 M.
6. Finalmente se procede a leer la FLUORESCENCIA: Lector de microplacas (*Varioskan Thermo Electron Corporation*): $\lambda_{\text{excitación}}: 405 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{emisión}}: 520 \text{ nm}$
7. Así, a partir de las medidas de fluorescencia obtenidas con las concentraciones de DNA conocido, se calcula la recta patrón con la que se valora el DNA de las muestras.

5. MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE NUCLEÓTIDOS DE ADENINA

Se determina mediante el sistema enzimático “*Luciferina/Luciferasa*” [26]. En la reacción de oxidación de la luciferina en presencia de ATP y O₂ catalizada por la luciferasa, se emite BIOLUMINISCENCIA que es proporcional a la cantidad de ATP presente en el rango picomolar.



Soluciones:

- Tampón de ATP (A2383-Sigma): Hepes 50 mM, MgCl₂ 10 mM, BSA 0.1%, pH=7.6
- Tampón de ADP (A2754-Sigma): Hepes 100 mM, MgCl₂ 5mM, KCl 5 mM, EDTA 1 mM, BSA 0.1%, pH=7.6, fosfoenolpiruvato (PEP, P7127-Sigma) 2 mM y piruvato quinasa (PK, P1506-Sigma) (20 UI/ml) a partir de una solución comercial saturada en SO₄(NH₄)₂ (666 UI/mg proteína, SIGMA).
- Solución de luciferina (L9504-Sigma): 0.1 mM (en tampón ATP).
- Solución de luciferasa (L9506-Sigma): 0.1 ó 1 mg/ml (en tampón ATP) dependiendo de la sensibilidad del aparato usado para medir la luminiscencia.
- Solución estándar de ATP (en tampón ATP): 0, 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5 y 10 μM ATP (0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 picomoles ATP/10 μl). Así, con la cantidad de luz emitida en cada caso, se construye una recta patrón que servirá para calcular el contenido de ATP (**figura 16**).
- Solución estándar de ADP (en tampón ADP): 0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 y 40 μM ADP (0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 picomoles ADP/5 μl). La concentración del estándar de ADP es 4 veces mayor que la de ATP porque posteriormente se diluye ½ en la reacción de conversión y se pipetea la mitad de muestra para la medida con luciferasa. Al igual que en el caso del ATP, se realiza una recta patrón para calcular la cantidad de ATP.

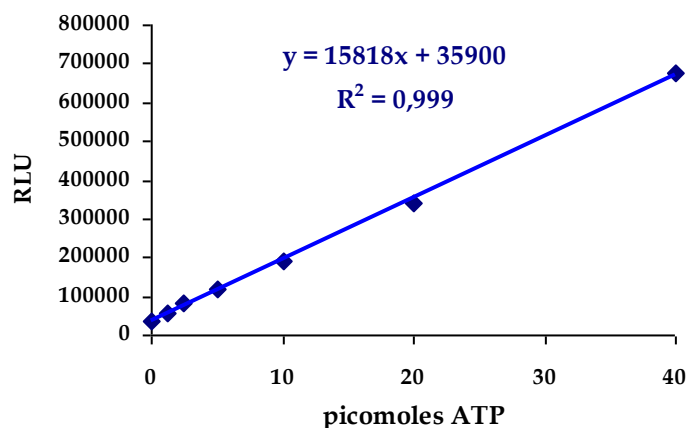


Figura 16. Recta patrón de ATP. Representación de las RLU (Unidades Relativas de Luminiscencia) frente a los picomoles de ATP conocidos, realizando un ajuste lineal para obtener la pendiente y la ordenada en el origen. A partir de esta ecuación, se calculan los picomoles de ATP de las muestras.

5.1. Incubaciones estáticas y extracción de los islotes

Se incuban grupos de 25 islotes durante 60 minutos a 37°C en 25 µl de KRBH suplementado con BSA 0.5% conteniendo las sustancias a probar para cada experimento. Transcurrida la hora se congelan los tubos inmediatamente en una mezcla de nieve carbónica-acetona (en algunos casos se realizarán varios lavados previos con PBS frío para eliminar las sustancias que pudieran interferir en la posterior medida del ATP). Posteriormente se añaden 20 µl de ácido perclórico (PCA) 1.35 M y se centrifugan los tubos durante 30 segundos a 13000 rpm para conseguir una mezcla instantánea por descongelación del medio. Manteniendo los tubos en hielo, se neutraliza la mezcla con 15 µl de una solución con KHCO₃ 2.8 M + Tris 0.1 M. Finalmente, se centrifugan de nuevo los tubos durante 60 segundos para sedimentar el perclorato potásico formado y se separa el sobrenadante (extracto final) para la posterior determinación de los nucleótidos de adenina.

► La extracción con PCA y la posterior neutralización con KHCO₃ + Tris también se realiza para los estándares de ATP y ADP preparados y para el BLANCO (25 µl de medio sin islotes).

5.2. Determinación del contenido de ATP y ADP en los extractos de islotes

MEDIDA DEL CONTENIDO DE ATP

Se pipetea 0.4 ml de la solución de luciferina en cubetas especiales para el luminómetro y se deja equilibrar hasta temperatura ambiente. Se añaden 10 µl de la solución de luciferasa 1 mg/ml y tras la adición de los 10 µl del extracto de islotes (o del estándar de ATP), se agita

la cubeta y se mide la producción de luz (lectura en el luminómetro, 1250 luminometer, LKB Wallac).

De la misma forma, parte de los resultados se midieron en dos lectores de microplacas distintos: *INFINITE M1000 (TECAN)* y *SYNERGY-2 (BIOTEK)*. En este caso, la reacción se llevó a cabo en placas opacas de 96 pocillos, añadiendo 0.1 ml de la solución de luciferina 0.1 mM + 10 μ l del extracto de islotes/soluciones estándar ATP + 10 μ l de la solución de luciferasa 0.1 mg/ml y registrando la luminiscencia.

MEDIDA DEL CONTENIDO DE ADP

Para medir la cantidad de ADP en los extractos de islotes se requiere la conversión del ADP en ATP a través de la reacción catalizada por la piruvato quinasa:



Se incuban 25 μ l del extracto de islotes con 25 μ l del tampón de ADP durante 30 minutos a 30°C. En estos nuevos extractos se mide, mediante la reacción de la luciferina/luciferasa, la cantidad original de ATP que contenían los islotes, más la cantidad de ADP original convertida en ATP (ATP + ADP). Se actúa de la misma forma que en la medida del contenido de ATP explicado anteriormente, tanto para las medidas en el luminómetro como para los lectores de microplacas, salvo que la cantidad de muestra/estándar que se pipetea para la reacción con la luciferina/luciferasa son 5 μ l. Por lo tanto, el contenido de ADP se obtiene restando la cantidad de ATP original de los extractos al contenido de ATP total de estos extractos.

6. EXPRESIÓN DE LUCIFERASA RECOMBINANTE EN CÉLULAS AISLADAS DE ISLOTES Y EN CÉLULAS INS-1

Se han realizaron experimentos de medida de luminiscencia en células aisladas de islotes o células INS-1 transfectadas con un adenovirus expresante de la enzima luciferasa. [Adenovirus: VECTOR BIOLABS. *Ad-CMV-luciferase*; *Adenovirus-Type 5 (dE1/E3)*; Promotor: *CMV*. Transgen: *Luciferase*; Transgen Species: *Firefly (P.pyralis)*; Titulación: 1×10^{10} PFU/ml].

Metodología

A. AISLAMIENTO DE ISLOTES MEDIANTE GRADIENTE (HISTOPAQUE)

Después de diseccionar el páncreas y de la digestión con colagenasa P, se lavan los islotes con Hanks (1x) tres veces dejando que sedimenten. Se centrifugan (1000 rpm, 1 minuto), se aspira el sobrenadante y se resuspende el precipitado con el medio para separar los islotes por gradiente de densidad: 10 ml de HISTOPAQUE-11191 (*Sigma*) y 6 ml HISTOPAQUE-1077 (*Sigma*) añadido gota a gota. Completar con 15 ml HBSS (*Hanks' Balance Salt Solution* 10x; *GIBCO-14065*), 20 mM Hepes, 0.1% BSA, 3 mM glucose, pH=7.4) y centrifugar (2500 rpm, 25 minutos a 4°C). Se recogen los islotes situados en la fase acuosa (intermedia) y se lavan de nuevo con HBSS.

B. AISLAMIENTO DE CÉLULAS PANCREÁTICAS MEDIANTE DISOCIACIÓN DE ISLOTES

Después de obtener los islotes por gradiente, para disociarlos se lavan 3 veces con HBSS (centrifugando y aspirando el medio) y se introducen en un eppendorf. Seguidamente se transfieren al "tampón de disociación" [HBSS (1x), Hepes 20 mM, EGTA 3 mM, glucosa 15 mM, BSA 2.5%, filtrado y congelado a -20°C] (100 islotes/ml) agitando durante 3 minutos a 37°C. A continuación se añade tripsina 0.05% (20 µl/ml *Trypsine* 0,05%, EDTA 0.53 mM in HBSS; *Cellgro-235-5476*) y se repite la agitación. Se pasan por una pipeta (*Plastibland*) tres veces y se realizan varios lavados con RMPI 1640 (1x) (medio de cultivo). Finalmente se realiza el conteo del número de células aproximado con la ayuda de una cámara de *Neubauer*.

C. TRANSFECCIÓN CON ADENOVIRUS EXPRESANTE DE LUCIFERASA

Para que la transfección fuera efectiva se necesitaron 100 partículas víricas por cada célula transfectada. Por lo tanto, dependiendo del número de células que se obtuvieran y sabiendo el "título" del stock del virus, se añadió el volumen determinado de dicho stock al extracto de células.

A continuación, se incubó la mezcla células-virus durante 3 horas a temperatura ambiente en continua agitación. Finalmente, para fijar las células a la placa, se mezcla el extracto con MATRIGEL (*BD Biosciences. BD-Matrigel™ Matrix 356231*) en frío, se agita y se plaquean las células (el volumen que se pipetea en la placa depende del número de células que se quiera poner en cada pocillo). Incubar durante unos minutos para que el gel solidifique y añadir medio de cultivo (RMPI) (cultivar 24-48 horas).

Las células INS-1 fueron cedidas amablemente por el Dr. Jude Deeney (PhD, Boston University, Boston, USA). En este caso, son transfectadas con el adenovirus incubando las células durante una noche a 37°C. A continuación, al igual que las células aisladas de islotes, se plaquean con MATRIGEL y se cultivan durante 48 horas.

D. EMISIÓN DE LUMINISCENCIA DE LAS CÉLULAS TRANSFECTADAS

La medida de luminiscencia se realizó en el lector de microplacas (*Tecan Infinite M1000*) con el programa Magellan-6 (*i-control 1.5*) en el cual pudimos medir la emisión de luz realizando ciclos de lectura cada 40-50 segundos. En primer lugar, se añade luciferina a 0.1 - 1 mM en condiciones experimentales basales (glucosa 5 mM) y se registra la luminiscencia cada ciclo de lectura. Cuando la señal de emisión está estabilizada, se añaden las soluciones a probar y se continúa registrando las lecturas hasta que se vuelve a estabilizar, deteniendo en ese momento el ensayo.

Finalmente se realiza una medida de la luminiscencia emitida por estas células transfectadas, mediante la captura fotográfica de las células después de estar expuestas a las sustancias experimentales (*Luminiscent Image Analyzer, FUJIFILM, Image Reader LAS-4000*) y el posterior análisis densitométrico con el programa *Quantity One (BIO-RAD Laboratories)*.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos obtenidos se ha realizado con el programa "*t de student*" con dos colas y 5-7 grados de libertad. Valores con $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS

La importancia de la sincronización celular en el mecanismo de secreción de insulina en islotes pancreáticos nos ha llevado a estudiar el funcionamiento de las moléculas que realizan esta función en este tipo de tejido. Las conexinas (Cxs) expresadas casi exclusivamente en las células β (Cx36), no sólo formarían canales intercelulares (“*gap junctions*”), necesarios para una respuesta secretora óptima de insulina, sino que también podrían formar “hemicanales” (conexonas) que permitirían la comunicación con el medio extracelular. Ha sido demostrado que la exposición a una depolarización elevada podría provocar la apertura de estos “hemicanales” y por lo tanto existir un intercambio de determinadas moléculas a través de ellos. Por ello, nos propusimos estudiar el efecto que pudieran tener estas condiciones depolarizantes tanto en la respuesta secretora estimulada por determinados secretagogos, así como en la difusión de determinados metabolitos (nucleótidos de adenina y aminoácidos).

1. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE HEMICANALES EN ISLOTES PANCREÁTICOS DE RATA

Para estudiar la funcionalidad de los “hemicanales” formados por conexinas, se han realizado ensayos de medida del contenido y liberación de aminoácidos y del contenido de ATP y ADP en condiciones depolarizantes en presencia o ausencia de Ca^{2+} . Para inducir una depolarización de las células se elevó la concentración de KCl a 70 mM (en presencia de diazóxido 250 μM) con o sin Ca^{2+} extracelular (la omisión del ión divalente se consiguió con una $[\text{Ca}^{2+}] = 0 \text{ mM} + \text{EGTA } 100 \mu\text{M}$) y con una concentración de NaCl adecuada para compensar la osmolaridad.

Con el objetivo de caracterizar el posible mecanismo responsable de esta disminución del contenido de determinados aminoácidos por un aumento en su liberación, se utilizaron determinados inhibidores específicos de las moléculas que forman los “hemicanales”.

1.1. EFECTO DE LA DEPOLARIZACIÓN EN EL CONTENIDO Y LIBERACIÓN DE AMINOÁCIDOS. ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN CON MEFLOQUINA

Para investigar el efecto de la depolarización sobre el contenido y la liberación de determinados aminoácidos, se incubaron islotes (previamente pre-incubados con glutamina 10 mM) durante una hora a 37°C en condiciones fisiológicas (glucosa 5 mM) o en condiciones depolarizantes, en presencia o ausencia de Ca^{2+} (glucosa 5 mM + KCl 70 mM). Como se observa en la tabla 1, la depolarización inducida por el KCl 70 mM disminuyó significativa-

mente el contenido (tabla 1A) de GABA, taurina (Tau), glutamato (Glu) de los islotes, a la vez que incrementó su liberación (tabla 1B). Para comprobar si esta salida podría estar mediada por exocitosis, se estudió su dependencia del Ca^{2+} extracelular. La omisión de Ca^{2+} (0 Ca^{2+}) (con [KCl] fisiológica) estimuló la liberación de GABA y Tau, observándose una disminución de su contenido. La combinación de KCl 70 mM + 0 Ca^{2+} incrementó este efecto.

Se ha demostrado que la depolarización en presencia o ausencia de Ca^{2+} podría provocar la liberación de aminoácidos neurotransmisores así como de nucleótidos de adenina en células del sistema nervioso a través de "hemicanales" formados por conexinas o panexinas [83]. Con el fin de caracterizar el posible mecanismo responsable observado en la liberación de aminoácidos provocada por KCl 70 mM + 0 Ca^{2+} , se estudió el efecto de diversos inhibidores de conexinas o panexinas. Así, un inhibidor de panexinas como es la carbenoxolona (CBX), no modificó significativamente el efecto provocado por la depolarización en la liberación y el contenido de los aminoácidos. Sin embargo, un bloqueante de las Cxs como es el ácido flufenámico (FLU), sí que suprimió parcialmente la liberación y la depleción del contenido de GABA y Tau en condiciones depolarizantes (resultados no mostrados). Dentro de estos mismos experimentos, se confirmó que el NPPB (ácido 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino)-benzoico), un inhibidor de los canales de cloro, no modificaba el efecto de la depolarización en la liberación y el contenido de los aminoácidos (resultados no mostrados). A tenor de los resultados obtenidos, se decidió ensayar un inhibidor más específico de las conexinas (Cx36 y Cx50) como es la mefloquina (MFQ) [111]. A $50 \mu\text{M}$, como se muestra en la tabla 2, bloqueó parcialmente la depleción de GABA de los islotes así como su liberación estimulada por KCl 70mM + 0Ca^{2+} . Sin embargo, no tuvo efectos significativos sobre el contenido y liberación del resto de los aminoácidos medidos.

Por otra parte, esta droga a concentraciones más elevadas (100 y $250 \mu\text{M}$) produjo una liberación de aminoácidos en condiciones no depolarizantes que llegaba a niveles similares a la liberación inducida por depolarización con omisión de Ca^{2+} (resultados no mostrados). Esto sugirió que, a estas concentraciones, la MFQ podría tener efectos inespecíficos sobre las células, como se pudo observar también en los experimentos de secreción de insulina.

A								
Contenido de aminoácidos (pmoles/ng DNA)								
	GABA	<i>p</i>	TAURINA	<i>p</i>	ASPARTATO	<i>p</i>	GLUTAMATO	<i>p</i>
<i>control</i>	2.89 ± 0.33 (7)	-	0.77 ± 0.05 (11)	-	2.04 ± 0.20 (12)	-	0.92 ± 0.11 (12)	-
KCl 70mM	2.01 ± 0.22 (7)	<0.05	0.48 ± 0.07 (7)	<0.005	1.87 ± 0.21 (7)	N.S	0.56 ± 0.07 (7)	<0.01
(0 Ca²⁺)	1.30 ± 0.20 (5)	<0.003	0.53 ± 0.13 (4)	N.S	1.13 ± 0.13 (5)	<0.01	1.19 ± 0.06 (6)	N.S
KCl 70mM (0 Ca²⁺)	0.75 ± 0.11 (13)	<0.0001	0.19 ± 0.04 (13)	<0.0001	0.98 ± 0.10 (13)	<0.0001	0.70 ± 0.04 (13)	N.S

B								
Liberación de aminoácidos (pmoles/ng DNA)								
	GABA	<i>p</i>	TAURINA	<i>p</i>	ASPARTATO	<i>p</i>	GLUTAMATO	<i>p</i>
<i>control</i>	1.20 ± 0.12 (11)	-	0.34 ± 0.04 (11)	-	1.65 ± 0.12 (11)	-	1.74 ± 0.15 (11)	-
KCl 70mM	1.96 ± 0.30 (7)	<0.02	0.78 ± 0.07 (7)	<0.0001	2.21 ± 0.20 (7)	<0.02	1.96 ± 0.24 (7)	N.S
(0 Ca²⁺)	2.10 ± 0.17 (4)	<0.002	0.57 ± 0.06 (11)	<0.005	1.78 ± 0.11 (3)	N.S	2.31 ± 0.18 (4)	N.S
KCl 70mM (0 Ca²⁺)	3.42 ± 0.24 (11)	<0.0001	1.00 ± 0.06 (11)	<0.0001	2.18 ± 0.11 (11)	<0.004	2.37 ± 0.22 (11)	<0.03

Tabla 1. Efecto de la depolarización (KCl 70 mM en presencia o ausencia de Ca²⁺) sobre el contenido (A) y liberación (B) de aminoácidos. Islotes pancreáticos expuestos a glucosa 5 mM (G5) (control) con o sin KCl 70 mM en presencia o ausencia de Ca²⁺ extracelular en islotes pre-incubados durante una hora con Gln 10 mM. ("0 Ca²⁺" significa que la concentración extracelular del ión es 0 mM y añadiendo EGTA 100 µM). Los datos se expresan como la media ± desviación estándar de la media (SEM) y entre paréntesis el número de ensayos (n). "p" expresa la significación estadística con respecto al control; N.S (no significativo).

Contenido de aminoácidos (pmoles/ng DNA)				
	GABA	TAURINA	ASPARTATO	GLUTAMATO
G5	2.52 ± 0.35 (5)	0.52 ± 0.07 (6)	1.66 ± 0.11 (6)	0.97 ± 0.04 (6)
G5 + 70KCl (0Ca ²⁺)	0.61 ± 0.08 (5) ⁺	0.10 ± 0.03 (5) ⁺	0.80 ± 0.10 (6) ⁺	0.68 ± 0.08 (6) ^{**}
G5 + 70KCl (0Ca ²⁺) + 25µM MFQ	0.86 ± 0.24 (5) ^{†, N.S}	0.14 ± 0.03 (6) ^{+, N.S}	0.90 ± 0.10 (6) ^{+, N.S}	0.82 ± 0.11 (6) ^{N.S, N.S}
G5 + 70KCl (0Ca ²⁺) + 50µM MFQ	1.05 ± 0.19 (6) ^{†, *}	0.14 ± 0.02 (6) ^{+, N.S}	1.02 ± 0.10 (6) ^{†, N.S}	0.95 ± 0.08 (6) ^{N.S, *}
Liberación de aminoácidos (pmoles/ng DNA)				
	GABA	TAURINA	ASPARTATO	GLUTAMATO
G5	1.26 ± 0.09 (6)	0.25 ± 0.01 (6)	1.37 ± 0.07 (6)	2.02 ± 0.19 (6)
G5 + 70KCl (0Ca ²⁺)	3.53 ± 0.35 (6) ⁺	0.73 ± 0.06 (6) ⁺	2.04 ± 0.06 (6) ⁺	2.64 ± 0.20 (6) [*]
G5 + 70KCl (0Ca ²⁺) + 25µM MFQ	2.95 ± 0.41 (6) ^{†, N.S}	0.68 ± 0.07 (6) ^{+, N.S}	1.88 ± 0.08 (6) ^{+, N.S}	2.38 ± 0.22 (6) ^{N.S, N.S}
G5 + 70KCl (0Ca ²⁺) + 50µM MFQ	2.38 ± 0.11 (6) ^{+, **}	0.66 ± 0.04 (6) ^{+, N.S}	1.87 ± 0.08 (6) ^{+, N.S}	2.42 ± 0.16 (6) ^{N.S, N.S}

Tabla 2. Efecto de la mefloquina (MFQ) en la disminución del contenido y liberación de aminoácidos inducida por depolarización (KCl 70mM ± Ca²⁺). Islotes pancreáticos expuestos a KCl 70 mM en ausencia de Ca²⁺ extracelular (70KCl + 0Ca²⁺) en presencia o ausencia de mefloquina (MFQ) 25 ó 50 µM. Los datos se expresan como la media ± desviación estándar de la media (SEM) y entre paréntesis el número de ensayos (n). Los símbolos en primer y segundo lugar indican la significación estadística con respecto a G5 y G5 +70KCl (0Ca²⁺), respectivamente. (*p<0.05, **p<0.01, †p<0.005, +p<0.001 y N.S).

1.2. EFECTO DE LA DEPOLARIZACIÓN EN EL CONTENIDO DE ATP Y EN EL COCIENTE ATP/ADP

Para estudiar el efecto de la depolarización sobre el contenido de ATP y sobre el cociente ATP/ADP, se incubaron islotes durante una hora en condiciones fisiológicas (glucosa 5 mM) o en condiciones depolarizantes en presencia o ausencia de Ca²⁺ (glucosa 5 mM + KCl 70 mM). Como se muestra en la tabla 3, se ensayaron distintos grados de depolarización (KCl 15, 30 y 70 mM) en los que se observó una disminución creciente del contenido de ATP de los islotes. La omisión exclusiva de Ca²⁺ ([KCl] fisiológica) no modificó el contenido de los nucleótidos de adenina (resultados no mostrados) y la combinación de KCl 70 mM + 0 Ca²⁺ provocaba una disminución del contenido de ATP a niveles similares a los que producía el KCl 70 mM en presencia de Ca²⁺ fisiológico. En ningún caso el cociente ATP/ADP se modificó en las distintas condiciones experimentales, indicando que la reducción del contenido de ATP no era debido a la disminución del grado de fosforilación.

No fue posible detectar la liberación de ATP de los islotes, por lo que concluimos que podría estar siendo hidrolizado por ectonucleotidasas. Se ensayaron dos inhibidores de estas nucleotidasas (POM-1 y ARL-67156) sobre la degradación de ATP 500 µM por grupos de 25 islotes. Un 50% del ATP fue degradado tras una hora de incubación y los inhibidores ensayados no consiguieron bloquearlo (resultados no mostrados).

Se ha descrito en sistema nervioso que una depolarización elevada causa una liberación de ATP al medio extracelular a través de los “hemicanales” formados por conexinas [83]. Por lo tanto, se estudió el efecto de la MFQ sobre la disminución del contenido de ATP en los islotes pancreáticos inducida por depolarización con omisión de Ca^{2+} . Así, como se observa en la tabla 3, 50 μM de esta droga bloqueó parcialmente este efecto, sugiriendo que probablemente el ATP podría ser liberado a través de estos “hemicanales” en células β pancreáticas.

	contenido ATP (pmoles/islote)		ATP/ADP	
G5	2.82 ± 0.14 (18)	<i>p</i>	1.19 ± 0.06 (18)	<i>p</i>
G5 + 15KCl	2.09 ± 0.06 (4)	<0.03	1.18 ± 0.04 (4)	N.S
G5 + 30KCl	1.81 ± 0.26 (4)	<0.005	0.90 ± 0.04 (4)	N.S
G5 + 70KCl	1.19 ± 0.13 (4)	<0.0001	1.04 ± 0.07 (4)	N.S
G5 + 70KCl (0Ca ²⁺)	1.28 ± 0.14 (12)	<0.0001	0.99 ± 0.08 (12)	N.S
G5 + 70KCl (0Ca ²⁺) + 50 μM MFQ	2.13 ± 0.27 (8)*	<0.02	1.21 ± 0.06 (8)	N.S

Tabla 3. Efecto de los distintos grados de depolarización (\pm MFQ) sobre el contenido de ATP y el cociente ATP/ADP. Islotes pancreáticos expuestos a distintos grados de depolarización (15, 30 y 70 mM KCl, 15KCl, 30KCl, 70KCl respectivamente) en comparación a la exposición con KCl 70mM + omisión de Ca^{2+} en presencia o ausencia de 50 μM mefloquina (MFQ). “*p*” expresa la significación estadística con respecto al control (G5). (* p <0.01 con respecto al valor obtenido con G5 + 70KCl (0Ca²⁺)).

1.2.1. Efecto de la depolarización sobre el contenido de ATP producido por glucosa y otros sustratos metabolizables

En el estudio de la generación de ATP a partir de concentraciones estimuladoras de glucosa (20 mM, G20) en condiciones depolarizantes o no depolarizantes (figura 17), comprobamos que la glucosa a esa concentración incrementaba los niveles de ATP intracelulares con respecto a glucosa basal (G5) y que estos niveles no se vieron afectados por una depolarización. Ello nos llevó a investigar el efecto del KCl 70mM sobre el contenido de ATP generado por otros sustratos metabolizables que producían niveles del nucleótido similares a los generados por G20. Como se observa en la figura 17A, a diferencia de G20, tanto el KIC (ácido α -cetoisocaproico), como el SSA (semialdehído succínico) 10 mM, no recuperaban totalmente los niveles de ATP disminuidos por el KCl 70 mM en ausencia de Ca^{2+} . El cociente ATP/ADP no fue modificado en ningún caso (figura 17B).

Por lo tanto, teniendo en cuenta que estos dos sustratos producen cantidades de ATP similares a los de G20 en condiciones fisiológicas y que sólo la glucosa a estas concentraciones protegía totalmente del efecto de la pérdida de ATP inducida por depolarización, se podría sugerir que no sólo el componente metabólico de la glucosa estaría compensando el efecto del KCl 70 mM, sino que además podría tener un efecto adicional mediante el bloqueo de la apertura de “hemicanales” por depolarización.

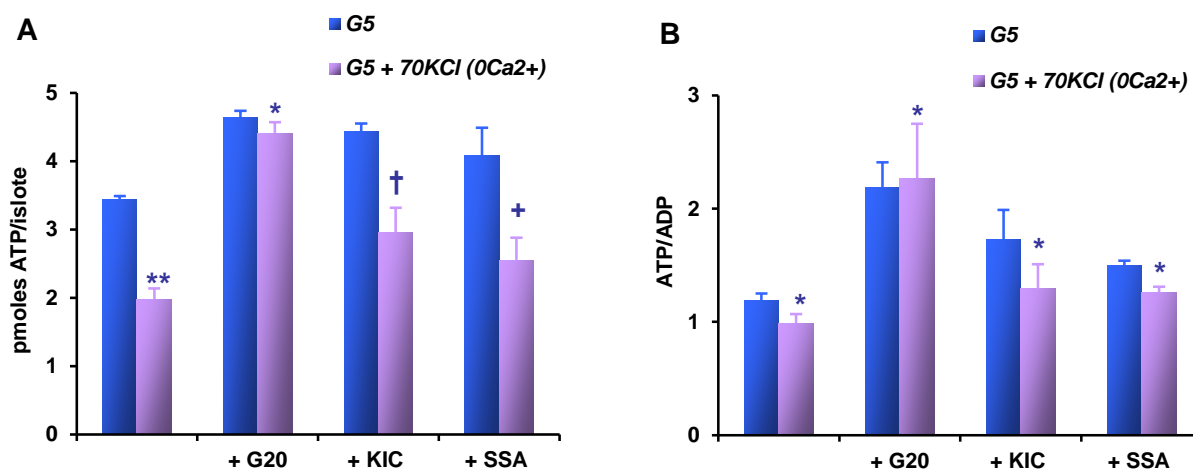


Figura 17. Efecto de la depolarización sobre el contenido de ATP (A) y el cociente ATP/ADP (B) producido por glucosa, KIC o SSA. Islotes incubados durante una hora a 37°C con glucosa 20 mM ($n=12$), ácido *a*-cetioisocaproico 10 mM (KIC) ($n=4$) o semialdehído succínico 10 mM (SSA) ($n=4$) en condiciones depolarizantes (G5 + 70KCl + 0Ca²⁺) o fisiológicas (G5). (*N.S, ** $p<0.0001$, † $p<0.02$, + $p<0.04$ con respecto a su correspondiente control, G5).

1.2.2. Comparación del efecto de la glucosa y análogos no metabolizables sobre la disminución del contenido de ATP inducida por depolarización

Con el objetivo de analizar el posible componente no metabólico de la glucosa que antagoniza la disminución del contenido de ATP provocada por el KCl 70 mM (0 Ca²⁺), se propuso comparar este efecto con el que pudieran tener análogos estructurales de la glucosa no metabolizables (L-glucosa o 3-o-metilglucopiranososa) o pobremente metabolizables (D-galactosa). Como se observa en las figuras 18A y 18B, la L-glucosa (L-Glu), la D-galactosa (D-Gal) y la 3-o-metilglucopiranososa (o-M-glu) a 15 mM, previnieron parcialmente el efecto de la depolarización sobre el contenido de ATP, manteniendo los niveles del nucleótido similares a los de islotes incubados con glucosa basal (G5) pero sin llegar a los valores alcanzados con G20. En el caso de los análogos del azúcar no se estaría generando ATP, como se observa en la diferencia de los cocientes ATP/ADP con respecto a G20.

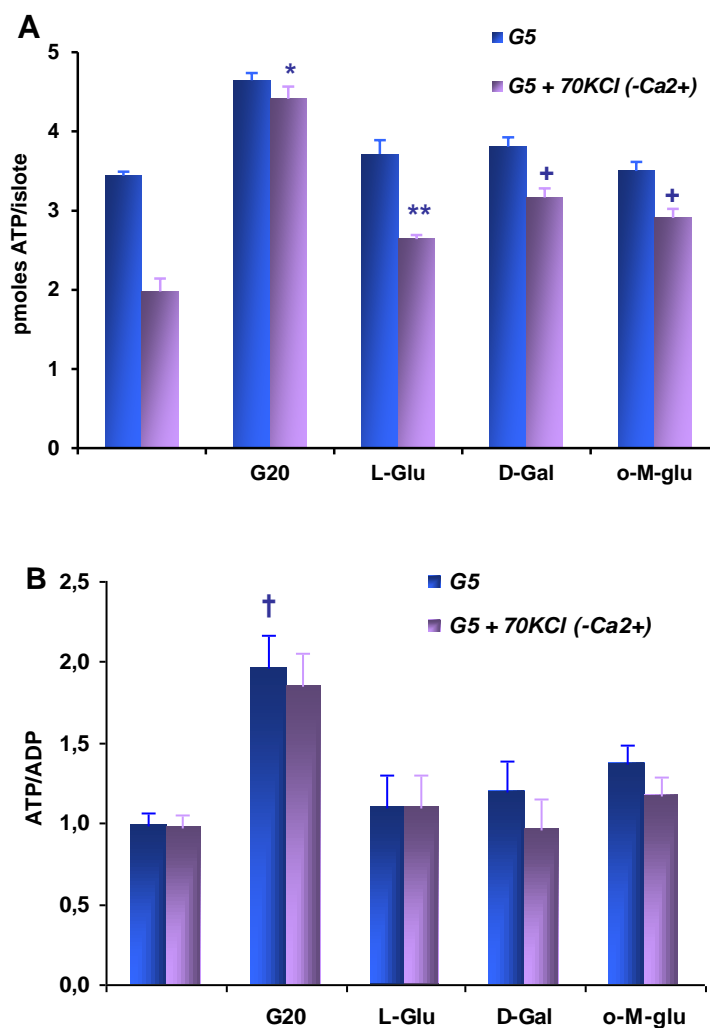


Figura 18. Efecto de la glucosa y análogos sobre la disminución del contenido de ATP (A) y el cociente ATP/ADP inducida por depolarización. Islotes incubados durante una hora a 37°C con glucosa 20 mM (G20) (n=12), L-glucosa 15 mM (L-Glu) (n=4), D-galactosa 15 mM (D-Gal) (n=4) y 3-o-metil-glucopiranososa 15 mM (o-M-glu) (n=4), en condiciones depolarizantes o fisiológicas. (A) * $p < 0.00001$, ** $p < 0.02$, + $p < 0.001$, con respecto al valor obtenido con G5 + 70KCl + 0Ca²⁺. (B) † $p < 0.002$ con respecto a G5. (L-Glu, D-Gal o o-M-glu no aumentan significativamente el cociente ATP/ADP con respecto a G5).

1.2.3. Estudio de la captación de ATP extracelular en islotes en condiciones depolarizantes

Para estudiar si la pérdida de ATP de los islotes inducida por depolarización pudiera ser reversible, se realizaron ensayos en los que se medía la captación de éste después de incubar los islotes durante una hora con distintas concentraciones de ATP extracelular (0, 1, 5, 10 y 20 mM) y después de un exhaustivo lavado de dichos islotes para disminuir al máximo la contaminación extracelular de ATP. Como se muestra en la figura 19A, el contenido de ATP en islotes incubados en condiciones fisiológicas (G5) a concentraciones crecientes de ATP extracelular no variaba significativamente, así como tampoco el cociente ATP/ADP (figura 19B).

Sin embargo, en condiciones depolarizantes (G5 + KCl 70 mM), sí que existió un aumento significativo tanto del contenido de ATP como del cociente ATP/ADP en proporción al aumento de ATP extracelular. A concentraciones extracelulares 1 ó 5 mM de ATP, el contenido del nucleótido se aproxima a los niveles alcanzados con G5 o G20, respectivamente, en islotes controles no “depolarizados”. A concentraciones extracelulares 10 y 20 mM de ATP se observó una diferencia significativa tanto del contenido de ATP como del cociente ATP/ADP de islotes expuestos a condiciones fisiológicas (G5) frente a condiciones depolarizantes (G5 + 70KCl), salvo en el caso del valor obtenido para el cociente ATP/ADP a 20mM de ATP debido probablemente a la alta desviación estándar.

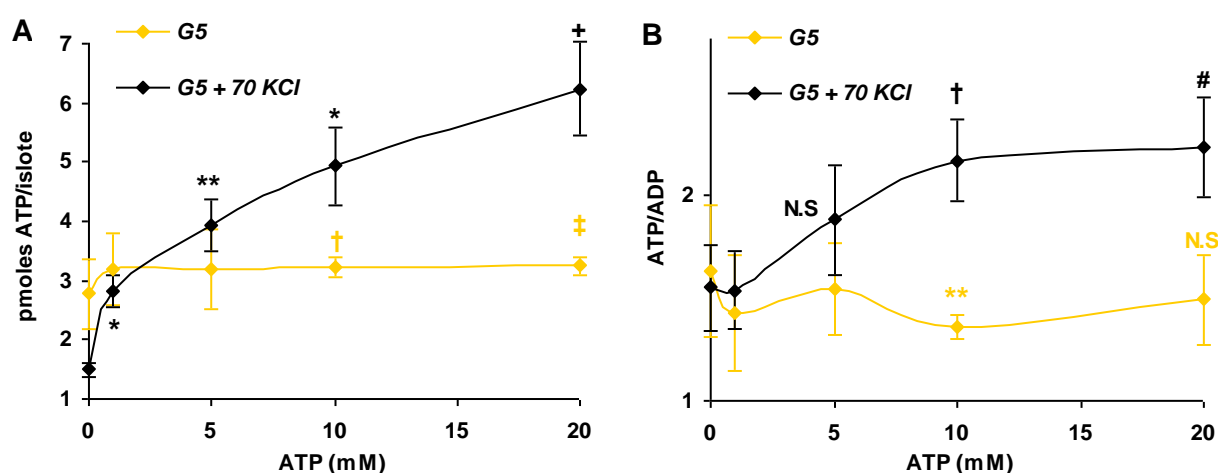


Figura 19. Captación de ATP en condiciones depolarizantes. Islotes incubados durante una hora a 37°C con concentraciones crecientes de ATP (0-20 mM) en condiciones fisiológicas (G5) (n=6) o depolarizantes (G5 + 70KCl) (n=8). (A) Contenido de ATP y (B) cociente ATP/ADP. Los símbolos que indican la significación estadística en color negro están referidos al valor de G5 + 70KCl con 0 mM ATP extracelular (* $p < 0.01$, ** $p < 0.005$, + $p < 0.001$, † $p < 0.03$, # $p < 0.04$) y los de color amarillo están referidos a su correspondiente valor con G5 (** $p < 0.005$, ‡ $p < 0.03$, † $p < 0.02$, N.S.)

Por otra parte, se estudió el efecto de la MFQ y de G20 sobre la captación de ATP extracelular en condiciones depolarizantes. Como se aprecia en la figura 20, 50 μ M de MFQ impidió casi totalmente el aumento del contenido de ATP a partir del ATP extracelular con KCl 70 mM, destacando este efecto sobre todo a concentraciones extracelulares elevadas (10 y 20 mM) del nucleótido. A 20 mM glucosa, la exposición a las concentraciones crecientes de ATP aumenta muy ligera pero no significativamente el contenido de ATP en los islotes en presencia de KCl 70mM, por lo que también bloquea la captación del nucleótido en estas condiciones. Además, a concentraciones elevadas de ATP extracelular (10 y 20 mM) no hay diferencias significativas entre el contenido de ATP de los islotes incubados con G5 + 70KCl o G20 + 70KCl, siendo sólo significativas a 1 y 5 mM de ATP.

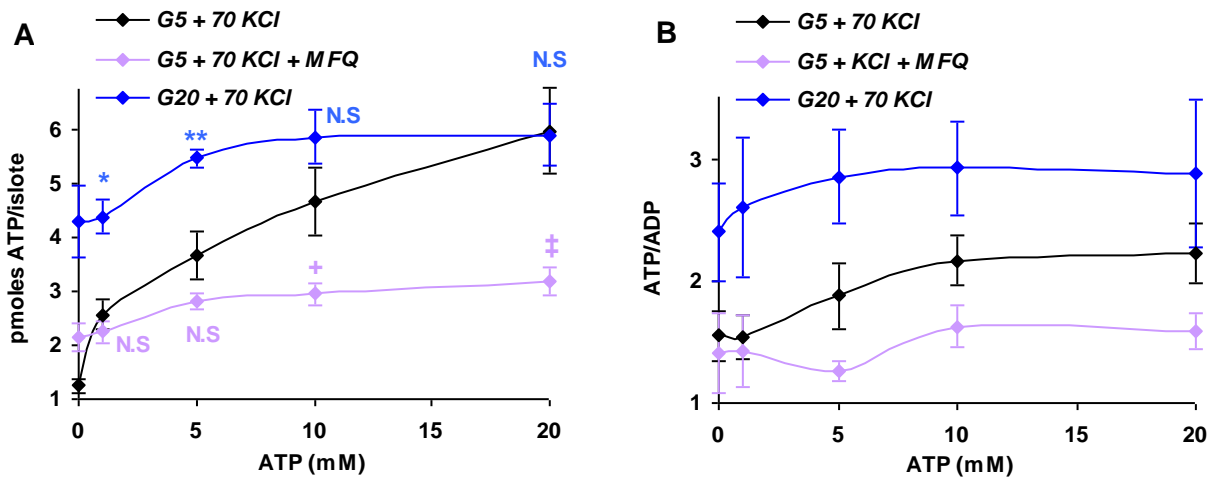


Figura 20. Efecto de la mefloquina (MFQ) en la captación de ATP en condiciones depolarizantes. Islotes incubados durante una hora a 37°C en condiciones depolarizantes (G5 + 70KCl) en presencia de MFQ 50µM (n=6) o glucosa 20 mM (G20) (n=6). **A**, contenido de ATP; **B**, cociente ATP/ADP. Los símbolos que indican la significación estadística en color azul (G20 + 70KCl) están referidos al correspondiente valor de G5 + 70KCl (* $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, N.S.) y los de color violeta (G5 + 70KCl + MFQ) están referidos al correspondiente valor de G5 + 70KCl (+ $p < 0.05$, ‡ $p < 0.02$, N.S.)

Al igual que en los ensayos realizados sobre el efecto de antagonistas de distintos canales por los que podría existir una difusión de aminoácidos, se estudió el efecto de la CBX, del FLU y del NPPB, antagonistas de panexinas, conexinas y canales de cloro, respectivamente, sobre la captación de ATP extracelular en condiciones depolarizantes. Como se muestra en la figura 21, la exposición de los islotes a 5 mM ATP extracelular en presencia de KCl 70mM aumentó significativamente el contenido de ATP de los islotes, siendo bloqueado significativamente por FLU, pero no por CBX ni NPPB.

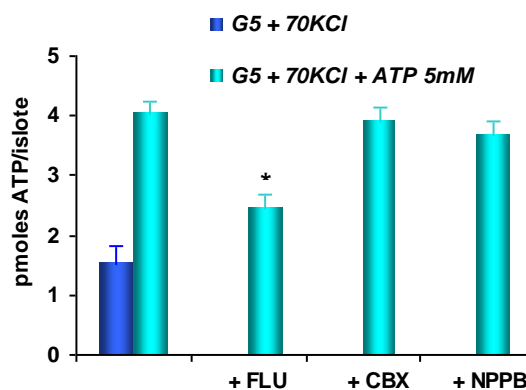


Figura 21. Efecto del ácido flufenámico (FLU), la carbenoxolona (CBX) o el 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino)-benzoico (NPPB) en la captación de ATP en condiciones depolarizantes. Islotes incubados con G5 + 70KCl + ATP 5mM con o sin FLU 300 µM (n=6), CBX 200 µM (n=5) o NPPB 100 µM (n=6). Únicamente el FLU bloqueó parcialmente la captación de ATP (* $p < 0.007$).

Por lo tanto, según estos resultados, la pérdida de ATP inducida por KCl 70 mM sería reversible añadiendo ATP extracelular en condiciones depolarizantes, siendo bloqueado parcial o totalmente por MFQ o G20, respectivamente, lo que volvía a apoyar la idea de la existencia de "hemicanales" funcionales formados por conexinas en las células β , permitiendo la difusión de ATP y otros metabolitos con el medio extracelular.

1.3. EFECTO DE LA DEPOLARIZACIÓN SOBRE LA SECRECIÓN DE INSULINA INDUCIDA POR NUTRIENTES SECRETAGOGOS. EFECTO DE LA MEFLOQUINA

Con el objetivo de estudiar el efecto de la depolarización sobre la secreción de insulina inducida por determinados nutrientes, se utilizó en esta ocasión el KCl 70 mM en presencia de Ca^{2+} (su ausencia bloquea la exocitosis). Para ello se midió la secreción de insulina en un sistema de perfusión (véase apartado 2.2 de materiales y métodos) donde se perfundían grupos de 40 islotes en paralelo durante 45 minutos en condiciones basales. A continuación se estimulaban con los nutrientes durante 30 minutos, para volver finalmente a las condiciones iniciales durante 25 minutos. Se recogieron fracciones de 0.5 ml de medio perfundido cada minuto para el posterior análisis radioinmunológico de la concentración de insulina.

El efecto del KCl 70 mM sobre la secreción estimulada por G20 o KIC 10 mM fue investigado. Según se observa en las figuras 22A y 22B, tanto G20 como el KIC dan lugar a una secreción bifásica de insulina, observándose un primer pico de secreción durante unos 10 minutos y posteriormente una segunda fase, que en el caso de la G20 es incluso creciente. La presencia de KCl 70mM suprimió ligera pero significativamente la 2ª fase de secreción inducida por G20 y la bloqueó casi totalmente en el caso del KIC, no afectando en ningún caso a la 1ª fase (tabla 4). Estos hallazgos inesperados revelaron que la depolarización con KCl podría tener efectos paradójicos en las células β y que su efecto estimulador de la exocitosis no reproducía fidedignamente el efecto específico de la glucosa para iniciar la secreción de insulina, como ha sido asumido universalmente hasta ahora.

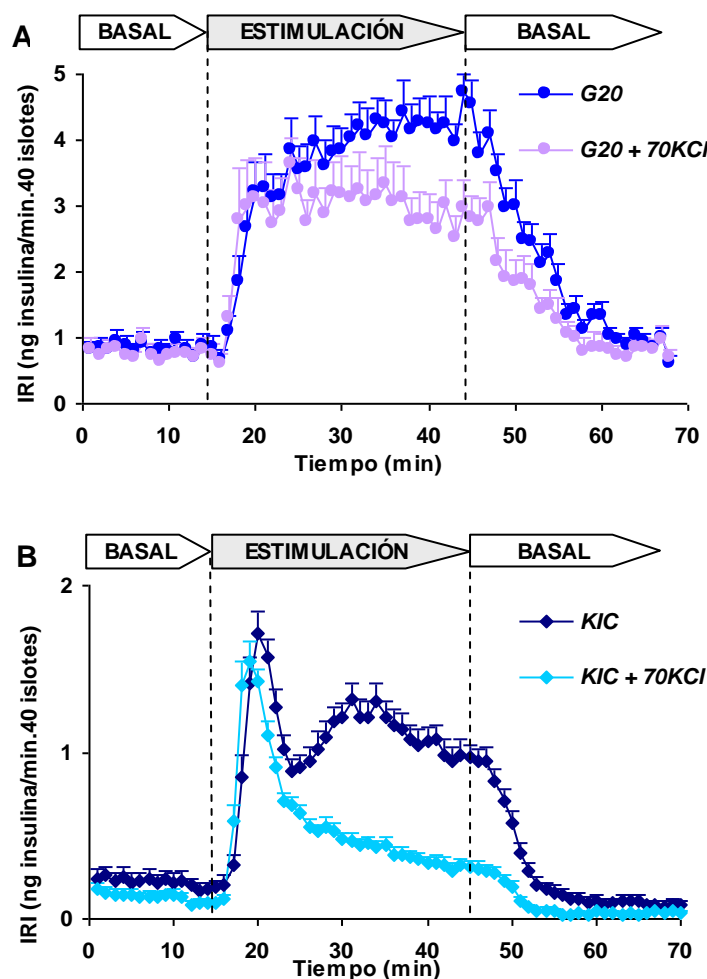


Figura 22. Efecto de la depolarización sobre la secreción de insulina inducida por G20 (A) o KIC (B). Grupos de 40 islotes se pre-perifunden durante 45 minutos en condiciones basales (G5) de los cuales se recogen los últimos 15; se estimulan durante 30 minutos con G20 o KIC 10 mM en presencia o ausencia de KCl 70 mM y finalmente se vuelve a las condiciones basales durante 25 minutos.

ng insulina/40 islotes	G20	G20 + 70KCl	KIC	KIC + 70KCl
1ª fase secreción (10')	23.7 ± 3.1 (12)	22.8 ± 5.0 (5) ^{N.S}	9.2 ± 0.7 (27)	8.6 ± 0.5 (27) ^{N.S}
2ª fase secreción (20')	86.0 ± 6.4 (12)	58.3 ± 9.1 (5)*	22.6 ± 1.7 (27)	8.8 ± 0.8 (27)**

Tabla 4. Suma de la cantidad de insulina en cada una de las dos fases de secreción a lo largo de la estimulación con G20 o KIC con o sin KCl 70 mM (figura 22). La 1ª fase de secreción corresponde a los primeros 10 minutos de estimulación y la 2ª fase a los 20 minutos siguientes. Los resultados significan la media ± desviación estándar y entre paréntesis el número de experimentos. (* $p < 0.03$, ** $p < 0.0001$ y N.S (no significativo) con respecto a su correspondiente control sin 70KCl).

La glucosa podría ejercer una doble función reguladora sobre la secreción dependiendo de su localización: inhibidora en los “hemicanales” o potenciadora en las “gap junctions”. El mantenimiento de la comunicación intercelular por estos últimos permitiría la sincronización

de la respuesta individual de las células β (difusión del aumento de $[Ca^{2+}]$ citosólica) para generar una respuesta óptima en cada islote. Los inhibidores de Cxs (más o menos específicos de la Cx36) bloquearían tanto la apertura de “hemicanales” como la comunicación por las “gap junctions”. Por lo tanto, su efecto sobre la secreción podría reproducir parcialmente el provocado por la delección del gen de la Cx36. Para ello se ensayó la MFQ como inhibidor más específico de esta Cx sobre la secreción inducida por determinados secretagogos.

Como se observa en la figura 23, la MFQ inhibió la secreción inducida por G20 de una manera dosis-dependiente. Mientras que no se observaron efectos significativos a una concentración de 10 μM de la droga, a 25 μM bloqueaba principalmente la segunda fase y a 50 μM lo hacía sobre ambas fases (tabla 5). Al igual que en el caso de los experimentos para comprobar el efecto de la MFQ sobre el contenido de aminoácidos, se estudió el efecto de una concentración más elevada de la droga (250 μM) sobre la secreción por G20. En este caso, provocó una fuerte estimulación de la liberación de insulina independientemente de la concentración de glucosa usada (G5 o G20) no volviendo además a niveles basales de la hormona después de retirar la droga (resultados no mostrados). Además se comprobó que en islotes incubados durante una hora, concentraciones tan elevadas de esta droga disminuían el contenido de insulina (307.2 ± 19.2 vs 521.3 ± 16.8 ng insulina/islote, $n=6$, $p<0.0001$), lo que sugería efectos inespecíficos a estas concentraciones también observados en la liberación masiva de aminoácidos.

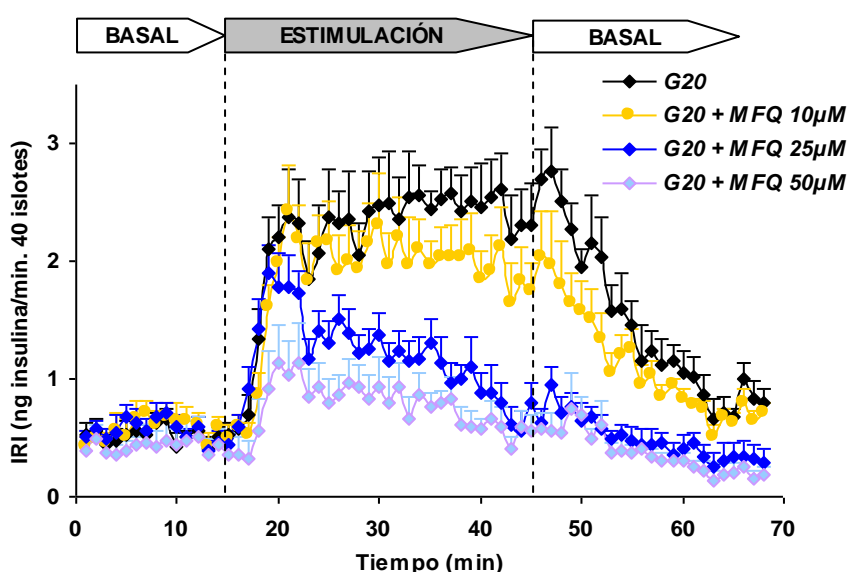


Figura 23. Dosis-respuesta de la mefloquina (MFQ) sobre la secreción de insulina estimulada por G20. Grupos de 40 islotes se pre-perifunden durante 45 minutos en condiciones basales (G5) de los cuales se recogen los últimos 15; se estimulan durante 30 minutos con G20 en presencia o ausencia de 10, 25 ó 50 μM de MFQ y finalmente se vuelve a las condiciones basales durante 25 minutos.

ng insulina/40 islotes	G20	G20 + MFQ 10 μ M	G20 + MFQ 25 μ M	G20 + MFQ 50 μ M
1ª fase secreción (10')	16.1 \pm 2.0 (6)	14.7 \pm 1.8 (6) ^{N.S}	13.2 \pm 1.8 (6) ^{N.S}	5.5 \pm 1.5 (5)*
2ª fase secreción (20')	50.9 \pm 6.2 (6)	42.1 \pm 6.1 (6) ^{N.S}	22.8 \pm 1.7 (6)*	12.8 \pm 2.2 (5)**

Tabla 5. Suma de la cantidad de insulina en cada una de las dos fases de secreción a lo largo de la estimulación con G20 + 10, 25 ó 50 μ M de MFQ (figura 23). La 1ª fase de secreción corresponde a los primeros 10 minutos de estimulación y la 2ª fase a los 20 minutos siguientes. Los resultados significan la media \pm desviación estándar y entre paréntesis el número de experimentos. (* p <0.003, ** p <0.0005 y N.S (no significativo) con respecto al control con G20).

La MFQ también inhibió parcialmente la secreción de insulina estimulada por otros dos nutrientes secretagogos como son el KIC y el SSA. En las figuras 24A y 24B, se observa que la secreción inducida por KIC resultó ser más sensible a la droga que la inducida por SSA, ya que una inhibición del 50% de esta secreción se consiguió con 25 y 50 μ M, respectivamente. La secreción estimulada por KIC fue inhibida significativamente por MFQ en sus dos fases de secreción, mientras que la inducida por SSA se apreciaba sobre todo en la segunda fase (tabla 6).

Estos resultados confirman la importancia ya conocida de las conexinas en el mecanismo de secreción de insulina a través de la formación de canales intercelulares entre las células β y cuya inhibición provocaba un bloqueo de la respuesta secretora.

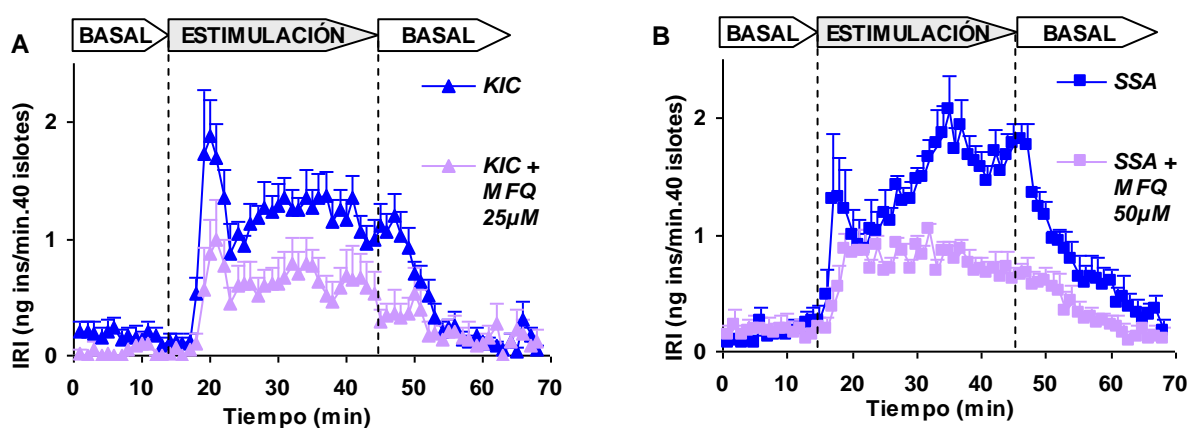


Figura 24. Efecto de la mefloquina (MFQ) sobre la secreción de insulina inducida por KIC (A) o SSA (B). Grupos de 40 islotes se pre-perifunden durante 45 minutos en ausencia de sustratos de los cuales se recogen los últimos 15; se estimulan durante 30 minutos con KIC o SSA 10 mM en presencia o ausencia de MFQ 25 y 50 μ M respectivamente.

<i>ng insulina/40 islotes</i>	KIC	KIC + MFQ 25 μ M	SSA	SSA + MFQ 50 μ M
1ª fase secreción (10')	9.5 \pm 1.4 (6)	4.4 \pm 1.6 (6)*	8.1 \pm 1.8 (6)	5.8 \pm 1.0 (6) ^{N.S}
2ª fase secreción (20')	25.0 \pm 3.0 (6)	12.7 \pm 2.6 (6)**	28.7 \pm 4.9 (6)	15.4 \pm 1.6 (6)***

Tabla 6. Suma de la cantidad de insulina en cada una de las dos fases de secreción a lo largo de la estimulación con KIC 10 mM o SSA 10 mM en presencia o ausencia de 25 ó 50 μ M de MFQ respectivamente (figura 24). La 1ª fase de secreción corresponde a los primeros 10 minutos de estimulación y la 2ª fase a los 20 minutos siguientes. Los resultados significan la media \pm desviación estándar y entre paréntesis el número de experimentos. (* $p < 0.04$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.03$ y N.S con respecto a su correspondiente control sin MFQ).

1.4. CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* DE LOS HEMICANALES EN CÉLULAS AISLADAS

Con el fin de estudiar la funcionalidad de los “hemicanales” en un entorno menos complejo como son los islotes pancreáticos, se observó el efecto de la depolarización en células aisladas de islotes de rata y en células INS-1 (línea celular de insulinoma de rata). Para ello, se planteó la estrategia de cuantificar la luminiscencia emitida por dichas células que previamente habían sido transfectadas con un adenovirus que codificaba para el gen de la luciferasa de luciérnagas (*firefly*). Por lo tanto, al exponer las células a una concentración determinada de luciferina, se emitiría luminiscencia por la reacción luciferina/luciferasa en presencia de ATP.

Después de aislar las células de los islotes y las INS-1 (véase apartado 5 materiales y métodos), se cultivaron en placas opacas de 96 pocillos para su posterior ensayo.

En primer lugar se realizó una dosis-respuesta de luciferina exponiendo las células a distintas concentraciones del compuesto en condiciones basales (G5) o condiciones depolarizantes (G5 + KCl 70 mM) y registrando la luminiscencia. Una vez estabilizada la señal, se realizó una captura fotográfica con un analizador de imágenes luminiscentes y finalmente se cuantificó la señal mediante un análisis densitométrico. Como se muestra en la figura 25A, la densidad de la señal luminiscente fue incrementando a medida que aumentaba la concentración de luciferina, sobre todo en el caso de las células expuestas a G5 + 70KCl, como se puede observar en la diferencia de pendientes de las curvas (3 veces mayor en condiciones depolarizantes), estando este incremento más acentuado a concentraciones más elevadas de la luciferina (figura 25B).

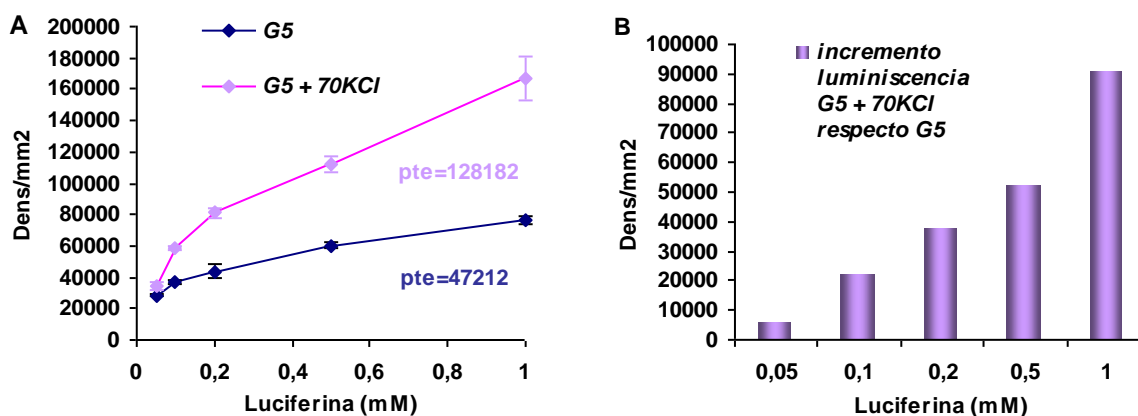


Figura 25. (A) Dosis-respuesta de luciferina sobre células INS-1 transfectadas con luciferasa bacteriana en condiciones basales (G5) o depolarizantes (G5 + 70KCl). Se mide la intensidad de la señal emitida después de su captura fotográfica y su análisis densitométrico (Densidad/mm²= Dens/mm²). **(B) Incremento de la luminiscencia dosis-dependiente de luciferina en condiciones de depolarizantes (G5 + 70KCl) con respecto a condiciones basales (G5).**

1.4.1. Efecto de la depolarización en células aisladas de islotes de rata

Para investigar el efecto que pudiera tener la depolarización sobre células aisladas de islotes transfectadas previamente con el gen de la luciferasa, se realizó un estudio en el tiempo de la luminiscencia emitida por estas células en distintas condiciones experimentales. Así, después de cultivar las células, se lavó el medio de cultivo y se incubaron en condiciones basales (G5) registrando la luminiscencia con el tiempo. Cuando se estabilizó la señal, se añadieron las condiciones experimentales en presencia o ausencia de KCl 70mM con luciferina 1 mM, volviendo finalmente a las condiciones iniciales.

La figura 26 muestra que la adición de KCl 70 mM aumentó la señal de luminiscencia emitida por las células con respecto a los controles ([KCl] fisiológica). Además, la presencia de G20 y MFQ 50 μ M en los ensayos con KCl, bloqueó parcialmente este aumento, no teniendo efecto la CBX 250 μ M.

Una vez terminado el ensayo, se llevó a cabo una captura fotográfica de la señal luminiscente emitida por cada grupo de células realizando finalmente un análisis densitométrico. Como se muestra en la figura 27, existe una clara diferencia de señal emitida en el caso en el que las células estaban expuestas a KCl 70 mM siendo este efecto disminuido ligera pero significativamente por G20 y MFQ, pero no por CBX (tabla 7).

Como se ha comentado anteriormente (véase Introducción), los “hemicanales” podrían ser permeables a moléculas de menos de 1kDa, lo que podría explicar el hecho de que al exponer las células a luciferina, hubiera un aumento de concentración intracelular de ésta,

reaccionando así con la luciferasa expresada por estas células y con el ATP intracelular. Por eso, el efecto del KCl explicaría el aumento de luminiscencia provocado por la apertura de dichos “hemicanales” y por lo tanto la entrada del sustrato.

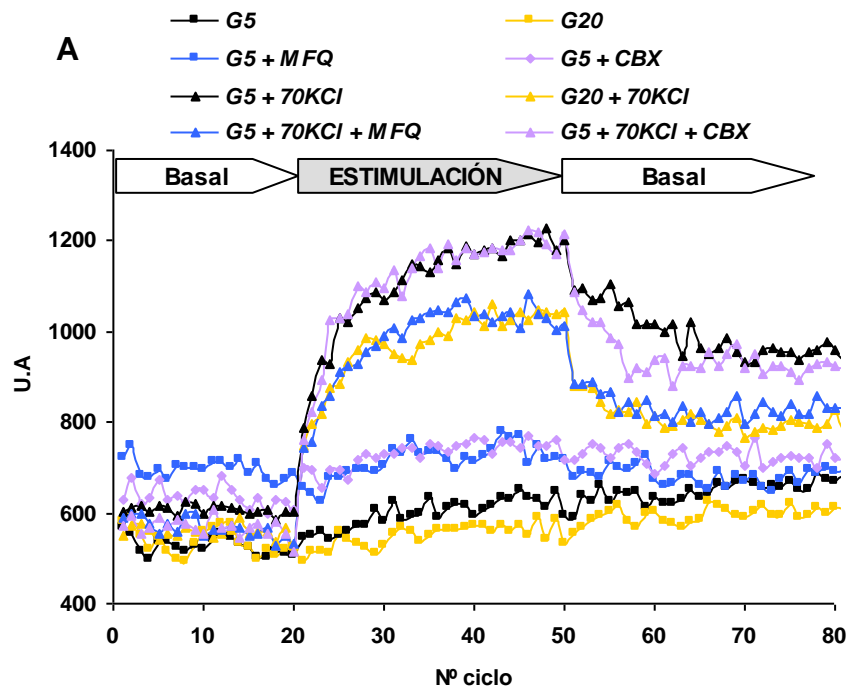


Figura 26. Efecto de la depolarización sobre la luz emitida con el tiempo por células aisladas de islotes transfectadas con luciferasa de luciérnaga (firefly). La luminiscencia (U.A, unidades arbitrarias) se registra cada ciclo de lectura (40 segundos/ciclo). En primer lugar se incuban las células con las condiciones basales (G5) y se registra la señal durante 20 ciclos; a continuación se añaden las condiciones experimentales con o sin KCl 70mM en presencia de glucosa 20 mM (G20), mefloquina 50 μ M (MFQ) o carbenoxolona 250 μ M (CBX) todo ello con luciferina 1 mM durante 30 ciclos; finalmente se vuelven a las condiciones basales.

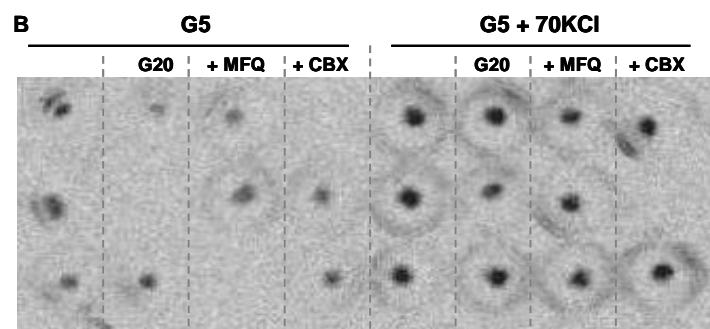


Figura 27. Efecto de la depolarización sobre la luz emitida por células aisladas de islotes transfectadas con luciferasa. Captura fotográfica después de finalizar el ensayo en condiciones basales (G5) o condiciones de alta depolarización (G5 + 70KCl) en presencia o ausencia de glucosa 20 mM (G20), mefloquina 50 μ M (MFQ) o carbenoxolona 250 μ M (CBX) todo ello en presencia de luciferina 1 mM.

Dens/mm ²	G5	G20	+ MFQ	+ CBX
G5	314.5 ± 35.0 (3)	385.0 ± 6.8 (2)	371.8 ± 21.7 (2)	339.3 ± 29.4 (2)
G5 + 70KCl	568.7 ± 29.5 (3)*	447.2 ± 23.1 (3) ^{N.S., +}	416.3 ± 7.5 (3) ^{N.S., †}	528.5 ± 15.2 (2) ^{+, N.S}

Tabla 7. Análisis densitométrico de la emisión de luminiscencia observada en la figura 27. Se realiza con el programa "Quantity One" (Bio-Rad) y se obtiene la densidad de la señal por mm². Los datos están expresados como la media ± desviación estándar y entre paréntesis el n° de replicados. (*p<0.005, +p<0.03, †p<0.007 y N.S.). Los símbolos en primer lugar indican la significación estadística con respecto a su correspondiente control (G5) sin 70KCl y los segundos se refieren al control G5 + 70KCl.

1.4.2. Efecto de la depolarización en células INS-1

Al igual que en los ensayos realizados en células aisladas de islotes, se estudió el efecto de la depolarización sobre una línea celular semejante a la célula β, como son las células INS-1, que expresan la Cx36 [103]. Para ello, se realizó el mismo ensayo y con las mismas condiciones que el realizado para las células aisladas de islotes, salvo que en este caso en el ciclo 80 de lectura, se estudió la captación de ATP extracelular en condiciones depolarizantes o no depolarizantes, añadiendo ATP 3 mM en presencia o ausencia de KCl 70 mM en las mismas condiciones de estimulación. Este tipo de línea celular necesita como glucosa basal una concentración de 2mM (G2) y una glucosa estimulante de 12mM (G12).

Como se aprecia en la figura 28, la exposición de la células INS-1 a KCl 70 mM provocó un aumento en la emisión de luz con respecto a las células que no fueron expuestas a condiciones depolarizantes. En este caso, ni la CBX ni la G12 tuvieron efecto sobre esta señal durante todo el periodo de estimulación, pero sin embargo la MFQ fue decreciendo ligera pero paulatinamente dicha señal. Además, al añadir ATP 3mM extracelularmente en presencia de KCl, se incrementaba significativamente la luminiscencia emitida, no teniendo efecto en ausencia de KCl. Este efecto se vio bloqueado parcialmente por MFQ, pero no por CBX o G12. Se realizó la captura fotográfica de la señal luminiscente emitida por cada grupo de células y finalmente se realizó un análisis densitométrico. El KCl 70 mM en presencia de ATP 3 mM aumentó significativamente la señal, siendo bloqueada parcialmente por MFQ y no por CBX o G12 (figura 29 y tabla 8).

Estos resultados podrían corroborar la idea de la existencia de "hemicanales" funcionales en estas células INS-1, que serían sensibles a depolarización, pero no regulados por glucosa.

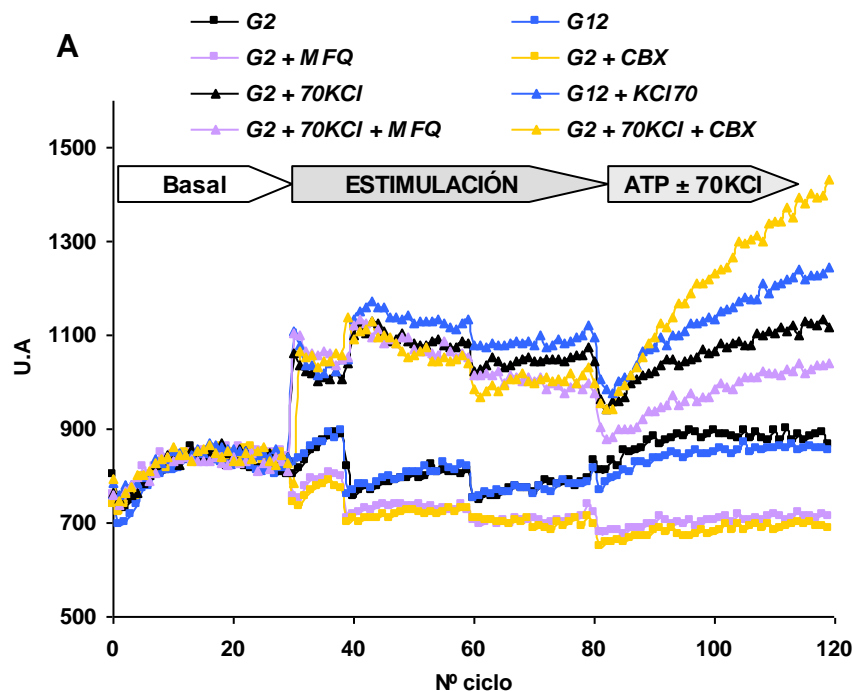


Figura 28. Efecto de la depolarización sobre la luz emitida con el tiempo por células INS-1 transfectadas con luciferasa de luciérnaga (firefly). La luminiscencia (U.A, unidades arbitrarias) se registra cada ciclo de lectura (40 segundos/ciclo). En primer lugar se incuban las células con las condiciones basales (G5) y se registra la señal durante 30 ciclos; a continuación se añaden las condiciones experimentales con o sin KCl 70mM en presencia de glucosa 20 mM (G20), mefloquina 50 μ M (MFQ) o carbenoxolona 250 μ M (CBX) todo ello con luciferina 1mM durante 50 ciclos; finalmente se añade ATP 3 mM en presencia o ausencia de KCl 70mM en las mismas condiciones de estimulación (con G12, MFQ o CBX).

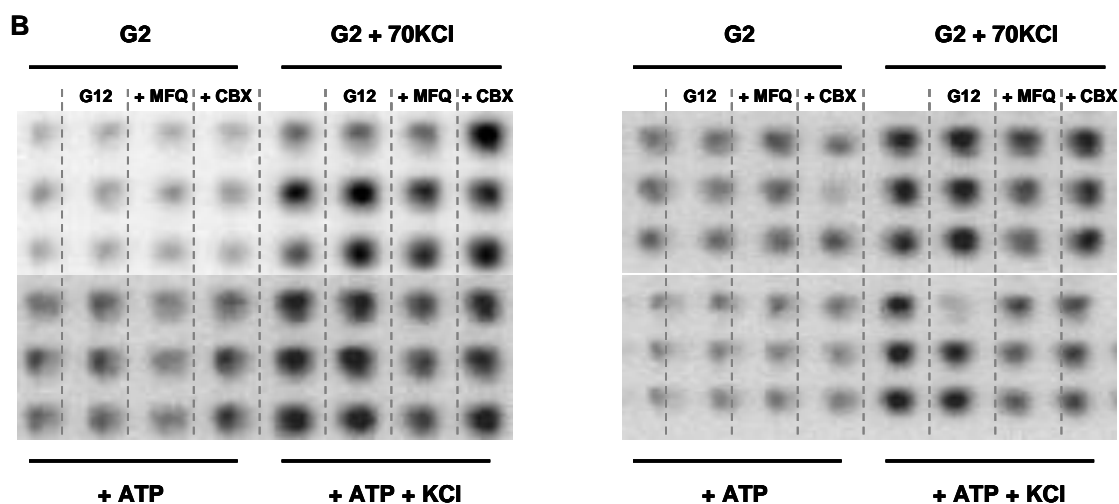


Figura 29. Efecto de la depolarización sobre la luz emitida por células INS-1 transfectadas con luciferasa. Captura fotográfica de células INS-1 después de finalizar el ensayo en condiciones basales (G2) o condiciones de alta depolarización (G12 + 70KCl) en presencia o ausencia de glucosa 12 mM (G12), mefloquina 50 μ M (MFQ) o carbenoxolona 250 μ M (CBX) y añadiendo ATP con o sin KCl 70 mM, todo ello en presencia de luciferina 1 mM.

Dens/mm ²	G5	G20	+ MFQ	+ CBX
G5 (+ATP 3mM)	590.2 ± 22.2 (11)	625.2 ± 19.7 (10)	616.2 ± 13.1 (11)	618.7 ± 20.2 (11)
G5 + 70KCl (+ATP 3mM + KCl 70mM)	852.0 ± 27.1 (12)*	859.4 ± 18.5 (12)*, N.S	720.9 ± 26.9 (11)**, **	916.8 ± 18.0 (10)*, N.S

Tabla 8. Análisis densitométrico de la emisión de luminiscencia observada en la figura 29. Se realiza con el programa "Quantity One" (Bio-Rad) y se obtiene la densidad de la señal por mm². Los datos están expresados como la media ± desviación estándar y entre paréntesis el n° de replicados. (*p<0.001, **p<0.002 y N.S.). Los símbolos en primer lugar indican la significación estadística con respecto a su correspondiente control (G5) sin 70KCl y los segundos con respecto al control G5 + 70KCl.

2. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE HEMICANALES EN ISLOTES PANCREÁTICOS DE RATONES KNOCK-OUT PARA LA Cx36 (Cx36-KO)

Para completar el estudio funcional de los "hemicanales" en células secretoras de insulina, así como de la importancia de la sincronización celular en el mecanismo de secreción de insulina, se adquirió un modelo animal de ratón (C57BL6J) en el que estaba suprimido el gen de la Cx36 (Cx36-KO), donado amablemente por el Dr. Luis Carlos Barrio Calvo de la Unidad de Neurología Experimental del Hospital Ramón y Cajal de Madrid. El objetivo era corroborar los resultados obtenidos anteriormente con un modelo más directo en el que la funcionalidad de los "hemicanales" así como de los "gap junctions channels" estuviera bloqueada. Para ello, se realizaron ensayos de medida de contenido y liberación de aminoácidos, contenido de ATP y ADP, así como de la secreción de insulina en condiciones depolarizantes o no depolarizantes para comprobar su efecto sobre este modelo de animal *transgénico* (Cx36^{-/-}, Cx36-KO) en comparación con los animales control (Cx36^{+/+}, *tipo salvaje*).

2.1. EFECTO DE LA DEPOLARIZACIÓN SOBRE EL CONTENIDO Y LA LIBERACIÓN DE AMINOÁCIDOS

Al igual que se realizó un ensayo para estudiar el efecto de la depolarización sobre el contenido y la liberación de determinados aminoácidos en islotes de rata, se quiso comprobar cómo podrían influir estas condiciones depolarizantes en islotes de ratón homocigotos (Cx36^{-/-}) para la delección de los dos alelos del gen de la Cx36 en comparación con los controles (Cx36^{+/+}). En este caso, la cantidad de un aminoácido como es la taurina (Tau) frente a los demás aminoácidos medidos es considerablemente mayor, incluso casi 3 veces más que la

cantidad de glutamato (Glu) o aspartato (Asp), que son los dos aminoácidos existentes más abundantes (resultados no mostrados).

Una exposición de los islotes a condiciones depolarizantes (G5 + KCl 70 mM) disminuyó significativamente el contenido de Tau a la vez que aumentó su liberación en los ratones control (Cx36^{+/+}) con respecto a las condiciones basales (G5). Sin embargo, este efecto sobre la taurina no se aprecia en los ratones KO (Cx36^{-/-}). Es decir, una delección del gen de la Cx36, la consiguiente inexpressión de la proteína y por lo tanto la no formación de “hemicanales”, estaría bloqueando la liberación de Tau provocada por KCl.

	Contenido taurina (pmol/25 islotes)		Liberación taurina (pmol/25 μ l)	
	Cx36 (+/+)	Cx36 (-/-)	Cx36 (+/+)	Cx36 (-/-)
G5	604.7 \pm 51.7 (5)	375.0 \pm 69.5 (5)	79.8 \pm 11.2 (5)	49.5 \pm 6.4 (5)
G5 + 70KCl	393.4 \pm 69.0 (5)*	350.3 \pm 69.0 (5) ^{N.S}	205.2 \pm 45.7 (4)**	47.6 \pm 9.9 (4) ^{N.S}

Tabla 9. Efecto de la depolarización sobre el contenido y liberación de taurina en islotes de ratón Cx36^{+/+} o Cx36^{-/-}. Los islotes son incubados durante una hora a 37°C en 25 μ l de medio (con las condiciones experimentales, G5 o G5 + KCl 70 mM), se retira el medio para medir aminoácidos (liberación) y se extraen los islotes con sulfosalicílico al 10% (contenido). Los datos se expresan como la media \pm desviación estándar y entre paréntesis el n° de experimentos. (*p<0.004, **p<0.02 y N.S. con respecto al valor con G5).

2.2. EFECTO DE LA DEPOLARIZACIÓN EN EL CONTENIDO DE ATP Y EN EL COCIENTE ATP/ADP

Con el objetivo de estudiar el efecto de la depolarización sobre el contenido de ATP en islotes pancreáticos de este modelo animal, se hicieron ensayos similares a los realizados para los islotes de rata. Es decir, se incubaron islotes durante una hora a 37°C con las diferentes condiciones de experimentación y se midió el contenido de ATP y ADP de los mismos. Además, para realizar un estudio en paralelo de la secreción de insulina de este modelo animal (véase posteriormente en el apartado 2.3), se investigó el efecto del KCl 70 mM con una concentración de Ca²⁺ fisiológica a una concentración basal de glucosa 5 mM (G5 + KCl 70 mM).

2.2.1. Comparación del contenido de ATP y del cociente ATP/ADP en islotes de ratones Cx36^{+/+}, Cx36^{+/-} y Cx36^{-/-} en condiciones basales o depolarizantes

Con el fin de comprobar si el grado de expresión de la Cx36 en estos islotes pudiera tener efecto sobre el contenido de ATP o el cociente ATP/ADP en condiciones basales o depolarizantes, se ha realizado una comparación del efecto del KCl 70 mM en condiciones basales o de glucosa alta (G20) entre ratones Cx36^{+/+} que sí expresarían la proteína, ratones heteroci-

gotos (Cx36^{+/-}) que la expresarían en un 50% y ratones homocigotos (Cx36^{-/-}) en los que la expresión estaría bloqueada totalmente.

En primer lugar, cabe destacar observando la figura 30A, que en condiciones basales (G5) con una [KCl] fisiológica, el contenido de ATP de los islotes Cx36^{-/-} fue significativamente mayor que el de los Cx36^{+/+} e intermedio en los islotes Cx36^{+/-}. Estos resultados también ocurrían en condiciones de glucosa alta (G20) y en condiciones de depolarización (G5 + 70KCl), donde el contenido de ATP de los islotes Cx36^{+/-} era significativamente mayor que en los Cx36^{+/+} y a su vez menor que en los Cx36^{-/-}. En cuanto al efecto del KCl 70 mM, se observó una disminución en el contenido del nucleótido en los islotes Cx36^{+/+}, pero sin embargo no fue así en los islotes Cx36^{-/-}, donde fue bloqueado el efecto de la depolarización. En el caso de los islotes Cx36^{+/-}, se observó una ligera pero no significativa disminución de este contenido. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la delección del gen de la Cx36, estaría bloqueando la disminución provocada por KCl 70 mM y que una expresión de esta proteína sólo en un 50%, evitaba sólo ligeramente este efecto, indicando que el grado de expresión de esta proteína determina el intercambio de ATP con el medio extracelular.

En la figura 30B, se muestra el cociente ATP/ADP en condiciones de glucosa basal (G5) o estimulante (G20) o en condiciones depolarizantes (G5 + 70KCl). Se observa que este cociente ATP/ADP no se modificó en glucosa basal ni por KCl en ninguno de los tres genotipos de Cx36, a pesar de las grandes diferencias en el contenido de ATP. Sin embargo, fue incrementado significativamente en los tres casos por G20. Por lo tanto, al igual que en el modelo animal de islotes de rata, la disminución de ATP inducida por depolarización no sería debida a una reducción del grado de fosforilación, ocurriendo igualmente una disminución en el contenido de ADP.

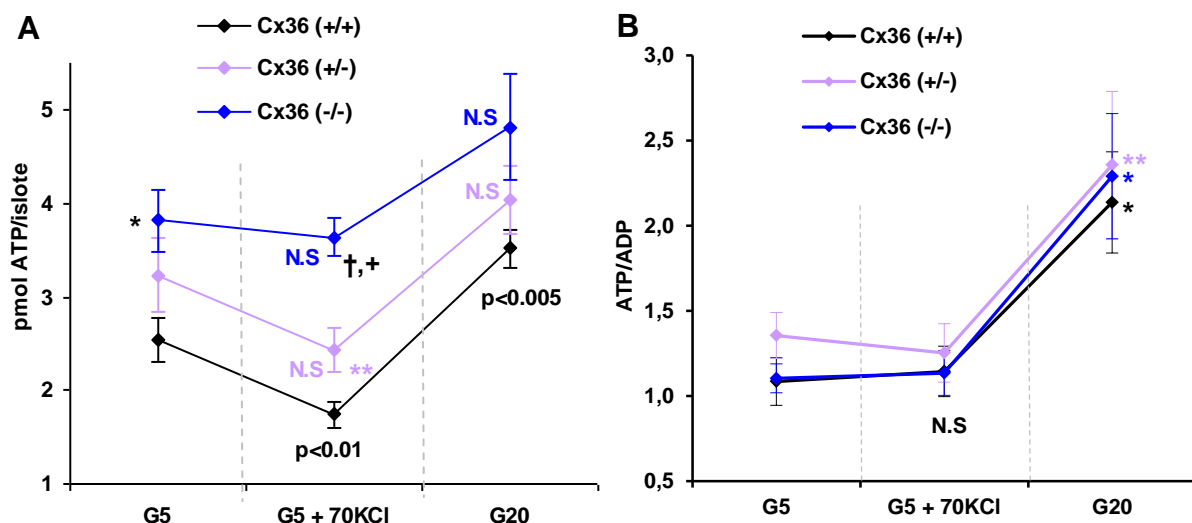


Figura 30. Efecto de la depolarización sobre el contenido de ATP (A) y el cociente ATP/ADP (B) en islotes Cx36^{+/+} ($n=11$), Cx36^{+/-} ($n=6$) o Cx36^{-/-} ($n=8$). Islotes expuestos a condiciones basales (G5) o glucosa 20 mM (G20). (A) La significación estadística representada ($p < 0.01$, $p < 0.005$ y N.S) está referida dentro del mismo tipo de islotes (color negro, rosado o azul) con respecto a su correspondiente valor en condiciones basales (G5). Además, los símbolos indican: * $p < 0.05$, respecto al valor de G5 de Cx36^{+/+}. ** $p < 0.02$ y + $p < 0.0001$, respecto al valor de G5 + 70KCl de Cx36^{+/+}. † $p < 0.003$, respecto al valor de G5 + 70KCl de Cx36^{+/+}. (B) La significación estadística indica: * $p < 0.01$, ** $p < 0.04$ y N.S. dentro del mismo tipo de islotes (color negro, rosado o azul), con respecto a su correspondiente valor en condiciones basales (G5).

2.2.2. Estudio de la captación de ATP extracelular en islotes Cx36^{+/+} y Cx36^{-/-} en condiciones depolarizantes

Para comprobar si la pérdida de ATP de los islotes inducida por depolarización en este modelo animal pudiera ser reversible, se estudió el contenido de ATP tras incubación con ATP extracelular 5 mM en condiciones depolarizantes en islotes Cx36^{+/+} o Cx36^{-/-}.

La figura 31A muestra que la exposición de los islotes control Cx36^{+/+} a una concentración 5 mM de ATP en presencia de KCl 70 mM, aumentó considerablemente el contenido de ATP pero no lo modificó en el caso de los islotes Cx36^{-/-}. El cociente ATP/ADP también aumentó ligera pero significativamente en el primer caso no siendo alterado en el segundo (figura 31B). Estos datos indicarían que la captación de ATP en presencia de KCl dependería también de la formación de los hemicanales a partir de conexinas.

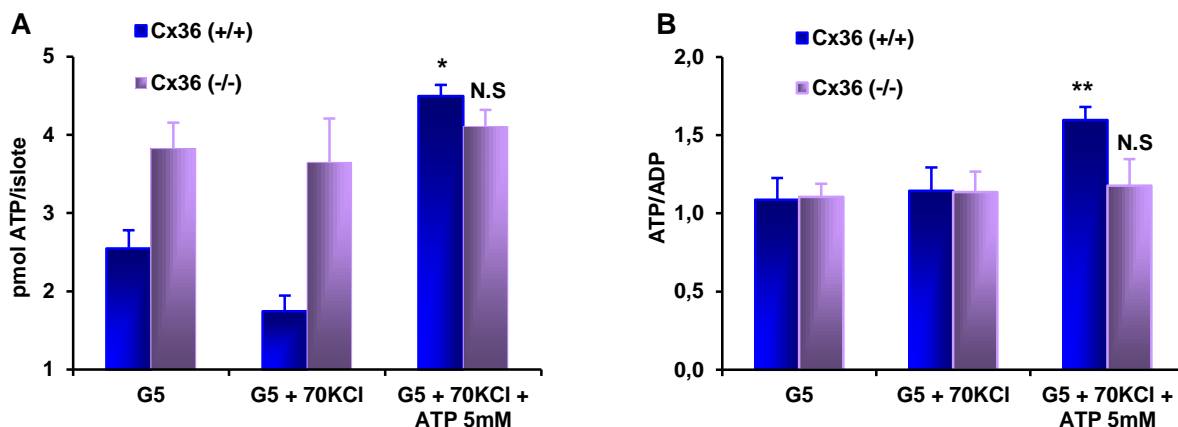


Figura 31. Efecto de la depolarización en la captación de ATP en islotes $Cx36^{+/+}$ ($n=11$) o $Cx36^{-/-}$ ($n=8$) Islotes expuestos a condiciones basales (G5) o depolarizantes (G5 + 70KCl) en presencia o ausencia de ATP 5mM. (A) Contenido de ATP. (B) Cociente ATP/ADP. (* $p<0.0005$, ** $p<0.05$ y N.S. indican la significación estadística respecto al valor de G5 + 70KCl de $Cx36^{+/+}$ y $Cx36^{-/-}$, respectivamente).

2.2.3. Efecto de G20 y MFQ sobre la pérdida de ATP inducida por depolarización en islotes $Cx36^{+/+}$

Para estudiar el efecto de una concentración elevada de glucosa (G20) y de un antagonista de las Cxs sobre la disminución del contenido de ATP en islotes pancreáticos en este modelo animal, se incubaron islotes control $Cx36^{+/+}$ en condiciones basales (G5) o depolarizantes (G5 + 70KCl) en presencia o ausencia de MFQ 50 μ M o G20 y se midió el contenido de ATP y de ADP.

Como se observa en las figuras 32A y 32B, una concentración de glucosa estimulante (G20) aumentó significativamente los niveles de ATP con respecto a glucosa basal (G5) y una depolarización con KCl 70 mM lo disminuyó. Esta disminución fue bloqueada parcialmente por MFQ y completamente por G20. Sin embargo, el cociente ATP/ADP no se alteró por KCl con respecto al control (G5) ni en presencia de MFQ, pero sí que fue modificado por G20, lo que indicaría que la pérdida de ATP inducida por depolarización también va acompañada de una disminución del contenido de ADP.

Por lo tanto, al igual que ocurría en el modelo de islotes de rata, tanto G20 como la MFQ serían capaces de proteger total o parcialmente, respectivamente de la pérdida de ATP y ADP en los islotes inducida por KCl en este modelo animal.

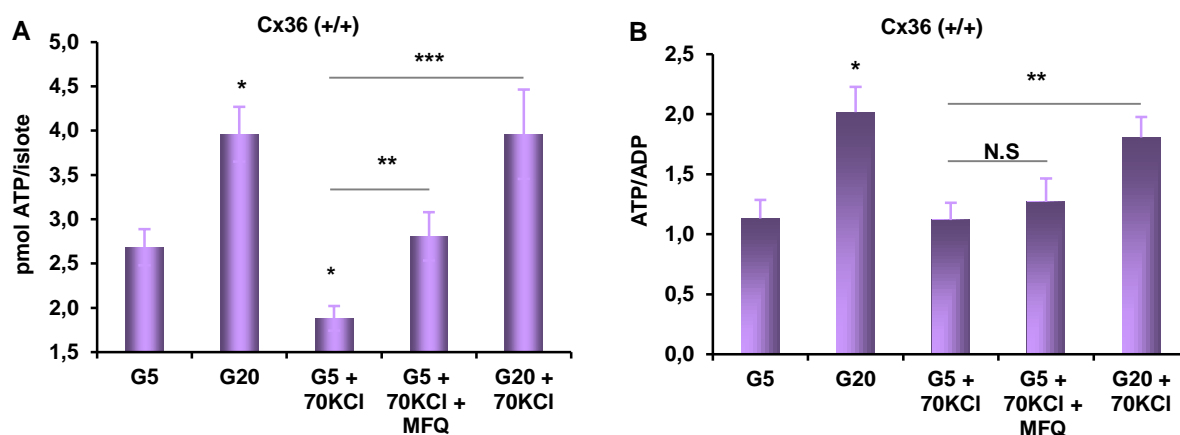


Figura 32. Efecto de la mefloquina (MFQ) y de la glucosa 20mM (G20) sobre la disminución del contenido de ATP inducida por KCl 70mM (A) y sobre el cociente ATP/ADP (B) ($n=5$). Islotes Cx36^{+/+} expuestos a condiciones basales (G5) o de glucosa elevada (G20) y/o condiciones depolarizantes (G5 + 70KCl) en presencia o ausencia de MFQ 50 μ M. (* $p<0.03$ con respecto al valor con G5. ** $p<0.04$, *** $p<0.02$ y N.S. con respecto al valor con G5 + 70KCl).

2.2.4. Estudio del efecto de análogos no metabolizables de glucosa sobre la disminución del contenido de ATP inducida por depolarización en islotes Cx36^{+/+}

Al igual que se realizó un estudio del efecto de análogos estructurales no metabolizables o pobremente metabolizables de glucosa en islotes pancreáticos de rata para comprobar si la generación de ATP por parte de G20 no era la única responsable del efecto protector de la disminución del contenido de ATP inducida por depolarización, se hizo un estudio del efecto de estos análogos en el modelo animal de ratón Cx36^{+/+}. Para ello se incubaron los islotes durante una hora a 37°C en condiciones basales (G5) o depolarizantes (G5 + 70KCl) en presencia o ausencia de L-glucosa (L-Glu), D-galactosa (D-Gal) o o-metil-glucopiranososa (o-m-Glu) a 15 mM y se estimó el contenido de ATP y el cociente ATP/ADP de los islotes.

Como se aprecia en las figuras 33A y 33B, estos análogos del azúcar bloquearon parcial pero significativamente la disminución del contenido de ATP inducida por KCl, no afectando al cociente ATP/ADP. Sin embargo, sólo recuperaban el contenido del nucleótido hasta prácticamente los niveles que se alcanzan con glucosa basal (G5) (sobre todo en el caso de la D-Gal y de la o-m-Glu). Además, se observa que los cocientes de ATP/ADP no alcanzaban los niveles que se consiguen con G20, que está alrededor de 2, por lo que la glucosa a altas concentraciones podría antagonizar la apertura de "hemicanales" en las células β . Por lo tanto, los análogos no metabolizables podrían ser antagonistas de estos canales sin afectar la producción de ATP ni interferir con las "gap junctions".

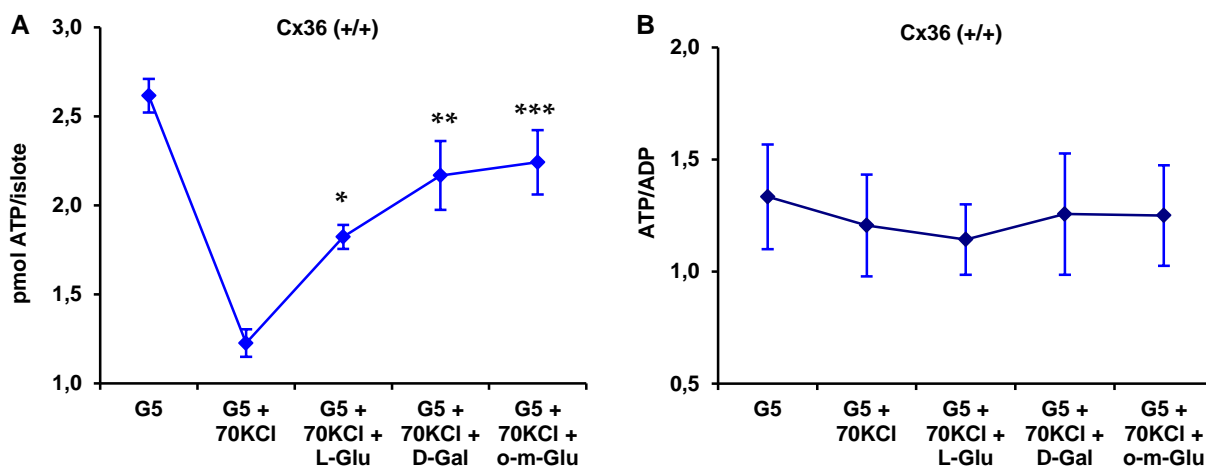


Figura 33. Efecto de los análogos de glucosa, L-glucosa (L-Glu), D-Galactosa (D-Gal) y o-metilglucosa (o-m-Glu) a 15 mM sobre la disminución del contenido de ATP inducida por depolarización (A) y sobre el cociente ATP/ADP (B). Isletos Cx36^{+/+} (n=4) expuestos durante una hora con las condiciones experimentales indicadas. (*p<0.001, **p<0.03 y ***p<0.04 con respecto al valor obtenido con G5 + 70KCl). El cociente ATP/ADP no se modificó significativamente en ningún caso.

2.3. ESTUDIO DE LA SECRECIÓN DE INSULINA EN ISLOTES PERIFUNDIDOS DE RATÓN Cx36^{+/+}, Cx36^{+/-} y Cx36^{-/-}

Para completar el estudio del comportamiento de los isletos pancreáticos de ratones KO para la Cx36 (homocigóticos o heterocigóticos) en comparación con los controles, se realizó un estudio de la secreción de insulina de estos isletos expuestos a diferentes condiciones experimentales.

En primer lugar se investigó la secreción inducida por una concentración estimulante de glucosa (20 mM) paralelamente en los tres genotipos de ratón: Cx36^{+/+}, Cx36^{+/-} y Cx36^{-/-}. Además, también se realizó un estudio del efecto del antagonista de Cxs (MFQ) sobre la secreción estimulada por G20 en isletos Cx36^{+/+}. Finalmente, se estudió la secreción inducida por KCl 70 mM en presencia o ausencia de ATP extracelular (5 mM) realizando una comparación entre los tres tipos de isletos.

2.3.1. Secreción de insulina inducida por G20 en isletos perifundidos

Para comprobar el efecto de la delección del gen de la Cx36 sobre el mecanismo de secreción de insulina en isletos pancreáticos en este modelo animal, se realizó un estudio de la secreción inducida por una concentración de glucosa estimulante (20 mM, G20) en cada uno de los tres genotipos. Para ello se perifundieron grupos de 40 isletos durante 45 minutos en condiciones basales (G5), estimulando a continuación durante 30 minutos con G20, para finalizar durante 20 minutos con las condiciones iniciales.

El resultado se muestra en la figura 34, donde se observa que los islotes Cx36^{+/+} responden a G20 con una secreción bifásica de insulina: se observa un primer pico de secreción (1ª fase) 4 veces mayor a la secreción basal y una segunda fase de secreción menor pero mantenida. Por el contrario, los islotes Cx36^{-/-} no sólo mostraron una estimulación de la secreción inducida por G20 fuertemente disminuida sino que también lo estaba la secreción basal (G5). Además, una delección del 50% del gen (Cx36^{+/-}) provocó que los islotes respondieran a G20 con una secreción de insulina de menor magnitud que los islotes control pero mayor que los Cx36^{-/-}. De hecho, la 1ª fase de secreción en estos islotes Cx36^{+/-} no fue significativamente menor que los islotes Cx36^{+/+}, mostrando sólo esa disminución en la 2ª fase. Por el contrario, la secreción observada en los islotes Cx36^{-/-} sí que fue menor en las dos fases, incluso en comparación con los islotes Cx36^{+/-} (tabla 10).

Estos resultados podrían sugerir, por tanto, que el grado de expresión de la Cx36 en este modelo animal, sería esencial en el mecanismo de secreción de insulina estimulada por glucosa, dado que la formación de canales que permiten la comunicación intercelular sería un requisito fundamental para una respuesta óptima.

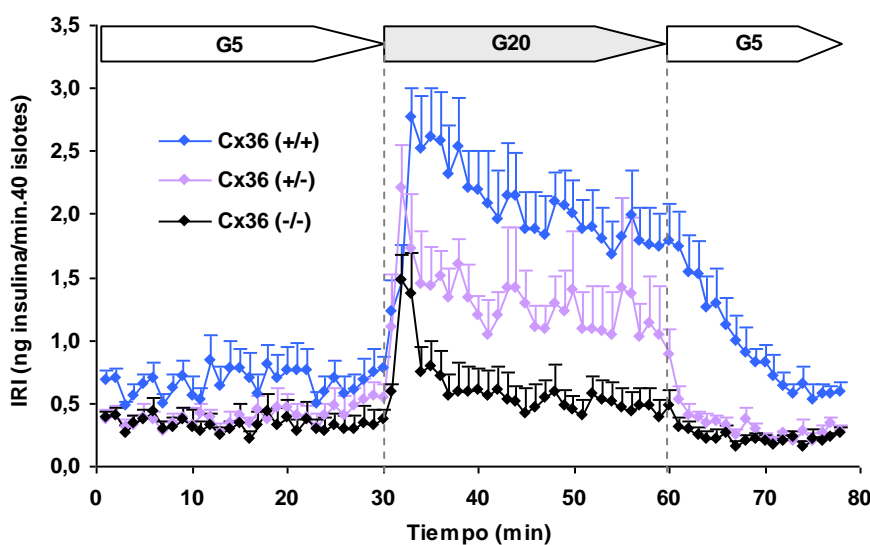


Figura 34. Secreción de insulina estimulada por glucosa 20 mM (G20) de islotes Cx36^{+/+} (n=10), Cx36^{+/-} (n=5) o Cx36^{-/-} (n=6). Grupos de 40 islotes se pre-perifunden durante una 45 minutos en presencia de glucosa 5 mM (G5) de los cuales se recogen los 30 minutos últimos. A continuación se estimulan con glucosa 20mM (G20) durante 30 minutos para finalmente volver a las condiciones iniciales durante 20 minutos.

Suma de la secreción de insulina por fases (G20) (ng insulina/40 islotes)					
	Cx36 (+/+)	Cx36 (+/-)	<i>p</i>	Cx36 (-/-)	<i>p</i>
<i>Fase basal (30')</i>	19.9 ± 3.4 (10)	11.9 ± 2.6 (5)	N.S	7.5 ± 1.2 (5)*	<0.03
<i>1ª fase de secreción (10')</i>	22.5 ± 2.6 (10)	14.8 ± 2.3 (5)	N.S	8.0 ± 1.5 (6)**	<0.001
<i>2ª fase de secreción (20')</i>	38.3 ± 5.1 (10)	21.2 ± 3.2 (5)	<0.04	10.0 ± 2.7 (6)**	<0.001
<i>Perifusión completa (80')</i>	95.4 ± 9.8 (10)	62.5 ± 9.2 (5)	<0.05	31.8 ± 6.3 (6) [†]	<0.0004

Tabla 10. Suma de la cantidad de insulina en cada una de los periodos de secreción para cada tipo de islotes (figura 34): “*Fase basal*”: los 30 minutos anteriores a la estimulación. “*1ª fase de secreción*”: los 10 primeros minutos de estimulación con G20. “*2ª fase de secreción*”: los 20 minutos últimos de estimulación con G20. “*Perifusión completa*”: los 80 minutos totales. Los datos se expresan como la media ± desviación estándar y entre paréntesis el número de ensayos (n). “*p*” expresa la significación estadística con respecto al valor de Cx36^{+/+} con su correspondiente fase. (**p*<0.03, ***p*<0.001 y †*p*<0.001 con respecto al valor de Cx36^{+/+}).

2.3.2. Efecto de la MFQ sobre la secreción de insulina en islotes Cx36^{+/+}

Para comparar el efecto de la delección del gen de la Cx36 sobre la secreción de insulina estimulada por glucosa con el que pudiera tener el bloqueo de esta proteína mediante el uso de un antagonista como es la MFQ, se realizó un ensayo de perifusión de islotes Cx36^{+/+} donde se midió la secreción de insulina inducida por G20 en presencia o ausencia de dicha droga a 50 µM.

La MFQ disminuyó significativamente la segunda fase de secreción estimulada por G20 en casi un 45%, sin modificar la primera (figura 35 y tabla 11), lo que indica que esta droga podría bloquear la sincronización necesaria para una óptima secreción pero sin tener un efecto tan drástico como la delección del gen de la Cx36.

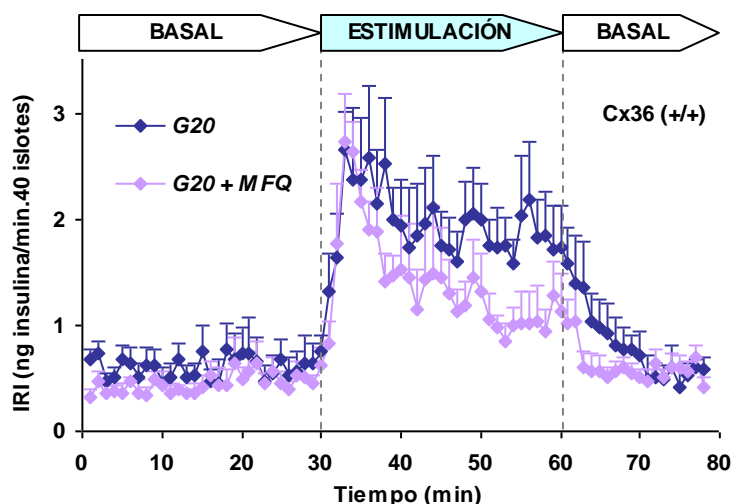


Figura 35. Efecto de la mefloquina (MFQ) sobre la secreción de insulina estimulada por glucosa 20 mM (G20) de islotes Cx36^{+/+}. Grupos de 40 islotes se pre-perifunden durante una 45 minutos en presencia de glucosa 5 mM (BASAL), se estimulan a continuación con G20 en presencia (n=5) o ausencia (n=10) de MFQ 50 μ M (ESTIMULACIÓN) durante 30 minutos y finalmente se restauran las condiciones iniciales (BASAL) durante otros 20 minutos.

Suma de la secreción de insulina por fases (G20 \pm MFQ 50 μ M) (ng insulina/40 islotes) en islotes Cx36 (+/+)		
	G20	G20 + MFQ 50 μ M
1ª fase de secreción (10')	21.5 \pm 3.2 (5)	18.3 \pm 1.7 (5) ^{N,S}
2ª fase de secreción (20')	42.0 \pm 5.3 (10)	23.6 \pm 5.6 (5)*
Perifusión completa (80')	100.7 \pm 9.2 (10)	66.5 \pm 9.7 (5) [†]

Tabla 11. Suma de la cantidad de insulina en cada uno de los periodos de secreción estimulada por G20 \pm MFQ 50 μ M (figura 35). Los datos se expresan como la media \pm desviación estándar y entre paréntesis el número de ensayos (n). (* p <0.05, $\dagger p$ <0.04 con respecto al valor con G20).

2.3.3. Estudio de la secreción de insulina en islotes expuestos a ATP extracelular en condiciones depolarizantes. Comparación entre los tres genotipos

Como ha sido demostrado anteriormente, el contenido de ATP aumenta en casi un 60% en islotes Cx36^{+/+} expuestos a ATP 5 mM extracelularmente en condiciones depolarizantes y no modificándose este contenido en los islotes Cx36^{-/-} (véase apartado 2.2.2, figura 31A). Por ello, se propuso estudiar el efecto de estas variaciones en el contenido del nucleótido en los islotes con ATP extracelular sobre la secreción de insulina estimulada por KCl 70 mM en los tres genotipos. Se realizó por tanto un ensayo de perifusión de islotes expuestos durante 45 minutos a condiciones basales (G5), estimulándolos posteriormente durante 30 minutos con G5 + KCl 70 mM en presencia o ausencia de ATP 5 mM y restaurando finalmente las condiciones iniciales.

Tal y como se muestra en la figura 36A, la depolarización con G5 + KCl 70 mM de islotes Cx36^{+/+} indujo un primer pico de secreción de aproximadamente 10 minutos que retornó a los valores con glucosa basal sin mostrar una segunda fase. La adición de ATP 5 mM durante la depolarización no modificó la primera fase de secreción pero provocó un aumento significativo de la segunda fase de liberación de insulina (tabla 12). En cambio, los islotes Cx36^{+/-} mostraron una estimulación de la secreción por G5 + 70KCl de menor magnitud que los islotes control (figura 36B) y la presencia de ATP extracelular indujo un ligero pero significativo aumento de la segunda fase, aunque menor que la observada en los islotes control. La delección total de la Cx36 provocó una fuerte disminución de esta secreción y la adición de ATP no restauró ni la primera ni la segunda fase de secreción inducida por KCl 70 mM (figura 36C y tabla 12).

Estos resultados indicarían que en condiciones depolarizantes, habría una captación de ATP que da lugar a una estimulación de la secreción de insulina en islotes control, coincidiendo con un aumento del cociente ATP/ADP mostrado anteriormente (apartado 2.2.2, figura 31B) y que la delección total del gen de la Cx36 (homocigotos) provocaría una reducción casi completa de esta secreción, estando parcialmente inhibida en los islotes KO de un solo alelo del gen (heterocigotos).

Sin embargo, debido a que la delección del gen de la Cx36 no sólo podría estar bloqueando la entrada de ATP sino que también podría estar inhibiendo la secreción por bloqueo de los canales “*gap junctions*”, se comprobó el posible efecto antagonista de un análogo no metabolizable de la glucosa sobre la secreción. Para ello se exploró la capacidad de la 3-o-metil-D-glucosa (o-m-Glu) para inhibir la estimulación de la secreción de insulina por ATP extracelular en islotes Cx36^{+/+} “depolarizados con KCl 70 mM. El resultado fue el bloqueo parcial de esta secreción en su segunda fase (figura 37). La o-m-Glu no estimuló la secreción en ausencia de ATP extracelular, como corresponde a un análogo permeable pero no metabolizable y su efecto podría atribuirse al bloqueo de “hemicanales”.

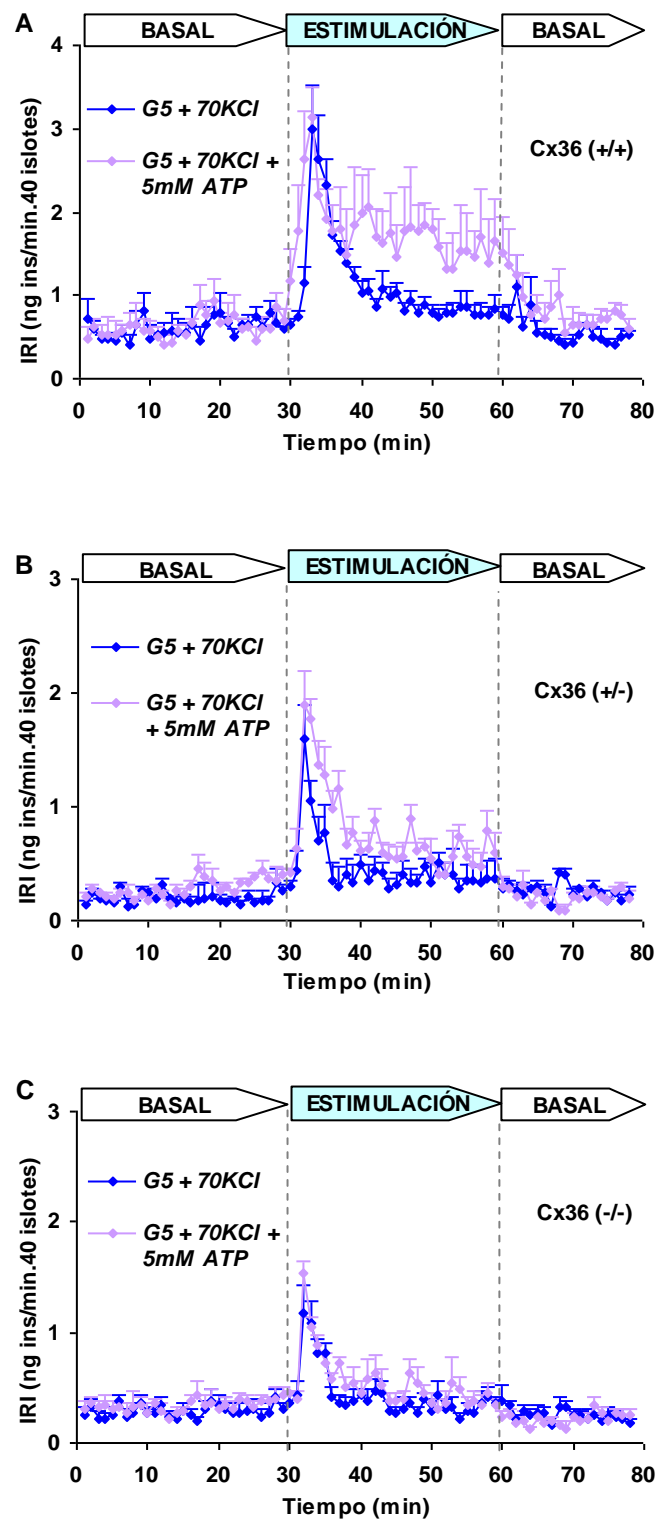


Figura 36. Efecto del ATP sobre la secreción de insulina en $Cx36^{+/+}$ ($n=5$) (A), $Cx36^{+/-}$ ($n=5$) (B) o $Cx36^{-/-}$ ($n=6$) (C) en condiciones depolarizantes. Grupos de 40 islotes se pre-perifunden durante 45 minutos en presencia de glucosa 5 mM (BASAL), se estimulan a continuación con G5 + KCl 70 mM en presencia o ausencia de ATP 5 mM (ESTIMULACIÓN) durante 30 minutos y finalmente se restauran las condiciones iniciales (BASAL) durante otros 20 minutos.

Suma de la secreción de insulina por fases (G5 + 70KCl ± 5mM ATP) (ng insulina/40 islotes)									
	Cx36 (+/+)			Cx36 (+/-)			Cx36 (-/-)		
	G5 + 70KCl	G5 + 70KCl + 5mM ATP	<i>p</i>	G5 + 70KCl	G5 + 70KCl + 5mM ATP	<i>p</i>	G5 + 70KCl	G5 + 70KCl + 5mM ATP	<i>p</i>
1ª fase de secreción (10')	16.7 ± 1.4 (5)	20.6 ± 3.9 (4)	N.S	6.5 ± 0.8 (5)**	11.2 ± 1.3 (5) [†]	N.S	6.2 ± 0.5 (5)*	7.5 ± 0.8 (4) [†]	N.S
2ª fase de secreción (20')	17.2 ± 1.7 (5)	34.2 ± 10.2 (3)	<0.05	7.3 ± 1.3 (5) [†]	11.8 ± 0.8 (5) [†]	<0.02	7.4 ± 1.2 (5) [†]	11.1 ± 2.9 (3) [±]	N.S
Perifusión completa (80')	62.4 ± 1.4 (5)	91.8 ± 20.1 (3)	<0.04	24.5 ± 3.3 (5)*	35.5 ± 1.5 (5) [†]	<0.02	26.7 ± 2.6 (5)*	34.7 ± 5.5 (3)*	N.S

Tabla 12. Suma de la cantidad de insulina en cada periodo de estimulación por G5 + 70KCl con o sin ATP 5mM en los tres genotipos de islotes: Cx36^{+/+}, Cx36^{+/-} o Cx36^{-/-} (figura 36). Los datos se expresan como la media ± desviación estándar y entre paréntesis el número de experimentos (n). “p” indica la significación estadística con respecto al valor con G5 + 70KCl para cada fase y para cada genotipo. (**p*<0.0001, ***p*<0.0002, †*p*<0.002, +*p*<0.02 y ±*p*<0.005 con respecto al valor de Cx36^{+/+} de su correspondiente condición experimental).

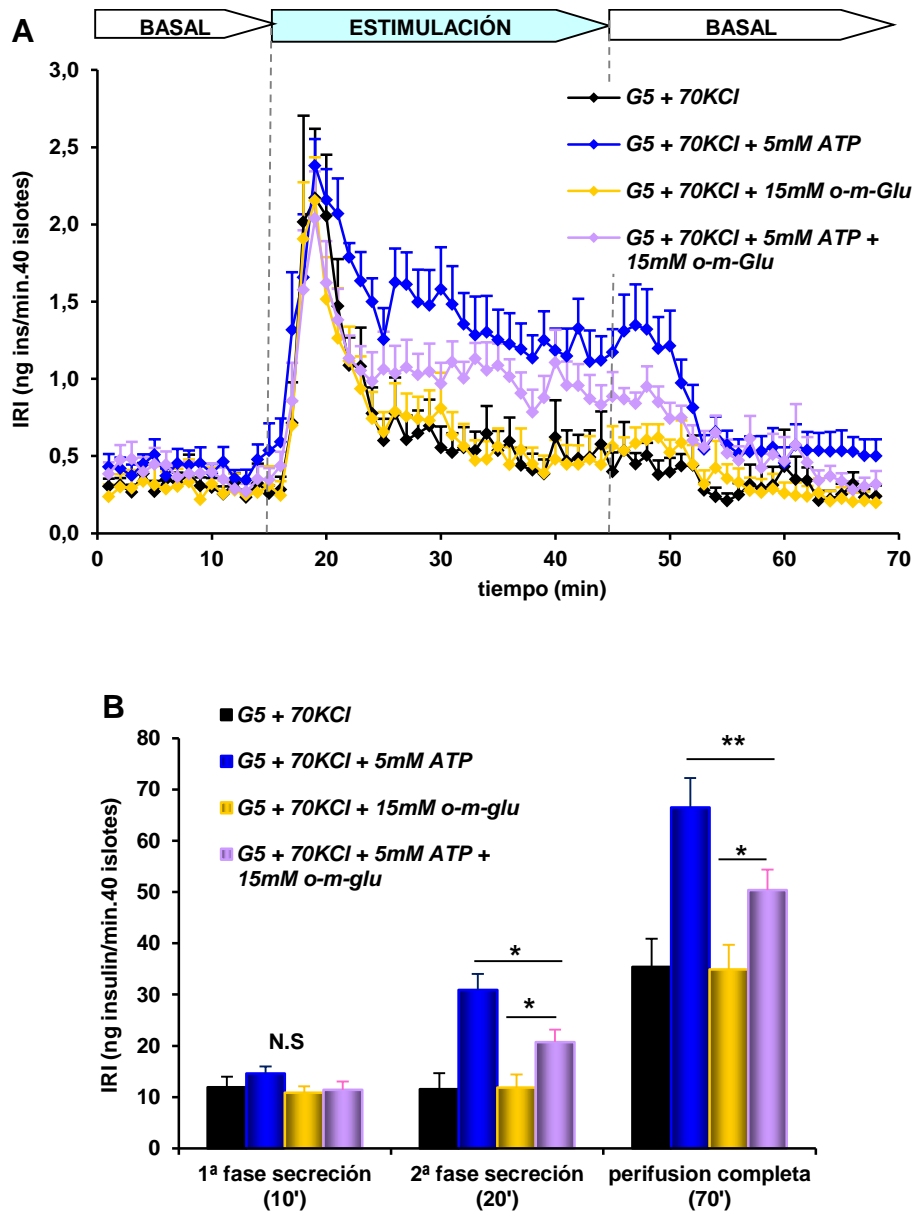


Figura 37. (A) Efecto de la *o*-metil-*D*-glucosa (*o*-*m*-*Glu*) sobre la secreción de insulina estimulada por ATP extracelular en condiciones depolarizantes (islotes Cx36^{+/+}, *n*=8). Grupos de 40 islotes se pre-perifunden durante 45 minutos en presencia de glucosa 5 mM (BASAL), se estimulan a continuación con G5 + KCl 70 mM en presencia o ausencia de ATP 5 mM (ESTIMULACIÓN) con o sin *o*-*m*-*Glu* 15 mM durante 30 minutos y finalmente se restauran las condiciones iniciales (BASAL) durante otros 20 minutos. (B) Suma de la cantidad de insulina en cada periodo de estimulación. (**p*<0.02, ***p*<0.03 y N.S.).

3. ESTUDIO DEL ACOPLAMIENTO ENTRE ATP Y SECRECIÓN DE INSULINA EN ISLOTES PANCREÁTICOS DE RATA

Una vez comprobada la posible funcionalidad de los “hemicanales” en dos modelos animales distintos y su apertura inducida por depolarización con KCl, como segundo objetivo de este trabajo se propuso analizar el mecanismo de acoplamiento entre la generación intracelular de ATP y la estimulación de la secreción de insulina en islotes pancreáticos, usando como modelo experimental los islotes “*permeabilizados*” por depolarización.

Es sabido desde siempre que la glucosa es el principal nutriente estimulador de la secreción de insulina en las células β mediante la producción de ATP, el cuál cierra los canales de K^+ dependientes de ATP (K_{ATP}) depolarizando las células y provocando la apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. La entrada de Ca^{2+} y su aumento intracelular provoca la exocitosis de los gránulos de insulina. Sin embargo, han sido escasos los estudios dirigidos a investigar qué proceso metabólico estaría más íntimamente ligado al proceso secretor: o bien alguna de las dos reacciones de la glucólisis que generan ATP citosólico por fosforilación ligada al sustrato como las catalizadas por la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) + 1,3-difosfoglicerato quinasa (DPK) o la piruvato quinasa (PK), o bien la oxidación mitocondrial del piruvato mediante la síntesis de ATP en la fosforilación oxidativa.

Por ello, se propuso en primer lugar estudiar el efecto de concentraciones variables de ATP aportado extracelularmente sobre la secreción de insulina de islotes en condiciones depolarizantes y en segundo lugar comprobar el posible acoplamiento entre la producción de ATP y la secreción de insulina estimulada por determinados metabolitos glucolíticos o mitocondriales.

3.1. DOSIS-RESPUESTA DE ATP SOBRE LA SECRECIÓN DE INSULINA

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la captación de ATP en condiciones depolarizantes, donde se observa un aumento de su contenido de manera dosis-dependiente de la concentración del nucleótido (véase apartado 1.2.3), se quiso estudiar el efecto de concentraciones variables de ATP sobre la secreción de insulina en estas condiciones, comparándolas con el efecto en condiciones fisiológicas.

Se observó que a una concentración de ATP 1 mM, en condiciones depolarizantes, el contenido de ATP de los islotes era similar al que se obtenía con una concentración de gluco-

sa basal (G5). De hecho, no se observaron diferencias significativas entre la secreción de insulina estimulada por G5 + 70KCl o por G5 + 70KCl + ATP 1 mM (resultados no mostrados). En cambio, como se muestra en la figura 38B, el aumento de la concentración de ATP extracelular a 5 ó 10 mM, sí que resultó en un incremento de la segunda fase de secreción en el caso del ATP 5 mM y de la primera y segunda fase en el caso del ATP 10 mM en condiciones depolarizantes (tabla 15).

Sin embargo, en condiciones basales (G5) y [KCl] fisiológica no se obtuvo un incremento de la secreción por parte del ATP 5 mM, obteniéndose un ligero aumento en el caso del ATP 10 mM (figura 38A y tablas 14). Para comprobar si este pequeño incremento pudiera ser debido a la estimulación de los receptores purinérgicos de membrana P_2 , se utilizó un antagonista de este tipo de receptores como es la suramina. Según se aprecia en la figura 39, una concentración de 50 μ M de este antagonista no modificó el ligero aumento de la secreción por ATP 10mM, pero sí que fue bloqueado por MFQ. Además, como se ha comentado anteriormente, este incremento de secreción no fue observado a 5 mM de ATP, incluso ni en la presencia de un potente antagonista del receptor de adenosina A_1 como era el CGS 15943 (resultados no mostrados), lo que podría sugerir que este aumento de la secreción por ATP no sería dependiente de receptores de membrana, sino que sería necesaria la entrada de ATP al interior celular, como indica el bloqueo por MFQ.

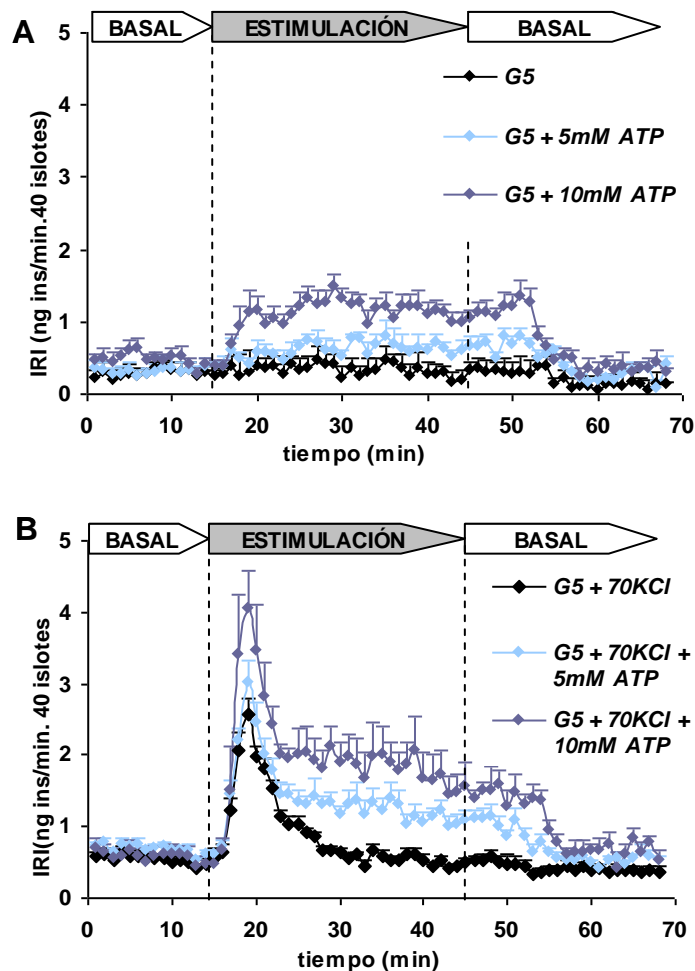


Figura 38. Dosis-respuesta de ATP sobre la secreción de insulina en islotes pancreáticos en condiciones fisiológicas (A) o depolarizantes (B). Grupos de 40 islotes se pre-perifunden durante 45 minutos en presencia de glucosa 5 mM (BASAL), se estimulan a continuación con G5 o G5 + KCl 70mM en presencia o ausencia de ATP 5 ó 10 mM (ESTIMULACIÓN) durante 30 minutos y finalmente se restauran las condiciones iniciales (BASAL) durante otros 20 minutos.

Suma de la secreción de insulina por fases (ng insulina/40 islotes)			
	G5	G5 + 5mM ATP	G5 + 10mM ATP
1ª fase de secreción (10')	3.2 ± 0.5 (5)	4.5 ± 1.0 (6) ^{N.S}	7.8 ± 1.8 (6) [*] , ^{N.S}
2ª fase de secreción (20')	5.8 ± 1.0 (5)	8.4 ± 1.7 (6) ^{N.S}	15.9 ± 1.8 (6) ^{**} ; ⁺
Perifusión completa (70')	12.4 ± 3.3 (5)	18.7 ± 2.4 (6) ^{N.S}	32.1 ± 4.2 (6) ⁺ ; [±]

Tabla 14. Suma de la cantidad de insulina en cada una de las fases de secreción estimulada por G5 en presencia o ausencia de 5 ó 10 mM de ATP (figura 38A). Los datos se expresan como la media ± desviación estándar y entre paréntesis el número de ensayos (n). La significación estadística indicada en primer lugar está calculada con respecto al correspondiente valor de la fase de secreción del dato control (G5): ^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.001$, [†] $p < 0.005$ y ^{N.S.} En el caso de los valores con G5 + 10 mM ATP, los símbolos en segundo lugar indican la significación estadística con respecto al valor con G5 + 5 mM ATP: ⁺ $p < 0.01$ y [±] $p < 0.02$ y ^{N.S.}

Suma de la secreción de insulina por fases (ng insulina/40 islotes)			
	G5 + 70KCl	G5 + 70KCl + 5mM ATP	G5 + 70KCl + 10mM ATP
1ª fase de secreción (10')	14.6 ± 1.1 (17)	17.5 ± 1.3 (18) ^{N.S}	22.8 ± 2.5 (5) ^{+, N.S}
2ª fase de secreción (20')	12.8 ± 1.0 (17)	24.4 ± 2.7 (17) [*]	38.5 ± 5.8 (5) ^{** , †}
Perifusión completa (70')	44.8 ± 3.3 (17)	69.7 ± 5.4 (18) [†]	92.0 ± 7.2 (5) ^{* , †}

Tabla 15. Suma de la cantidad de insulina en cada una de las fases de secreción estimulada por G5 + 70KCl en presencia o ausencia de 5 ó 10 mM de ATP (figura 38B). Los datos se expresan como la media ± desviación estándar y entre paréntesis el número de ensayos (n). La significación estadística indicada en primer lugar está calculada con respecto al correspondiente valor de la fase de secreción del dato control (G5 + 70KCl): * $p < 0.002$, ** $p < 0.0001$, † $p < 0.0005$, + $p < 0.003$ y N.S. En el caso de los valores hallados con G5 + 70KCl + 10 mM ATP, los símbolos en segundo lugar indican la significación estadística con respecto al valor con G5 + 70KCl + 5 mM ATP: ‡ $p < 0.03$ y ± $p < 0.05$ y N.S.

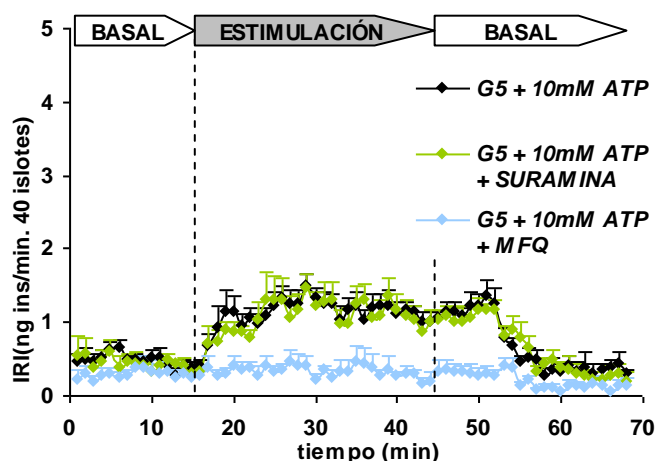


Figura 39. Efecto de la suramina o de la mefloquina (MFQ) sobre la secreción de insulina inducida por ATP 10mM en condiciones no depolarizantes ([KCl] fisiológica). Grupos de 40 islotes se pre-perifunden durante 45 minutos en presencia de glucosa 5 mM (BASAL), se estimulan a continuación con G5 + ATP 10 mM en presencia o ausencia de suramina 50 μ M o MFQ 50 μ M (ESTIMULACIÓN) durante 30 minutos y finalmente se restauran las condiciones iniciales (BASAL) durante otros 20 minutos.

3.1.1. Efecto de la MFQ sobre la secreción de insulina estimulada por ATP extracelular en islotes "depolarizados"

Por otra parte, al igual que en los ensayos de medida de captación de ATP en condiciones de depolarización, en los que se estudió el efecto de la MFQ (véase apartado 1.2.3), también se comprobó el efecto de este inhibidor de Cx36 sobre la secreción de insulina estimulada por ATP extracelular. Los datos obtenidos indicaron que la MFQ bloqueaba la secreción inducida por ATP 5 mM en su segunda fase, pero no la primera (figura 40A), inhibiendo las dos fases de secreción estimuladas por ATP 10 mM (figura 40B y tabla 16). Estos resultados

podrían indicar que la estimulación de la secreción de insulina por ATP en estas condiciones depolarizantes, dependería de la captación del nucleótido a través de los “hemicanales” formados por Cxs, lo que coincidiría con los datos obtenidos sobre el contenido de ATP en presencia de KCl con o sin el inhibidor.

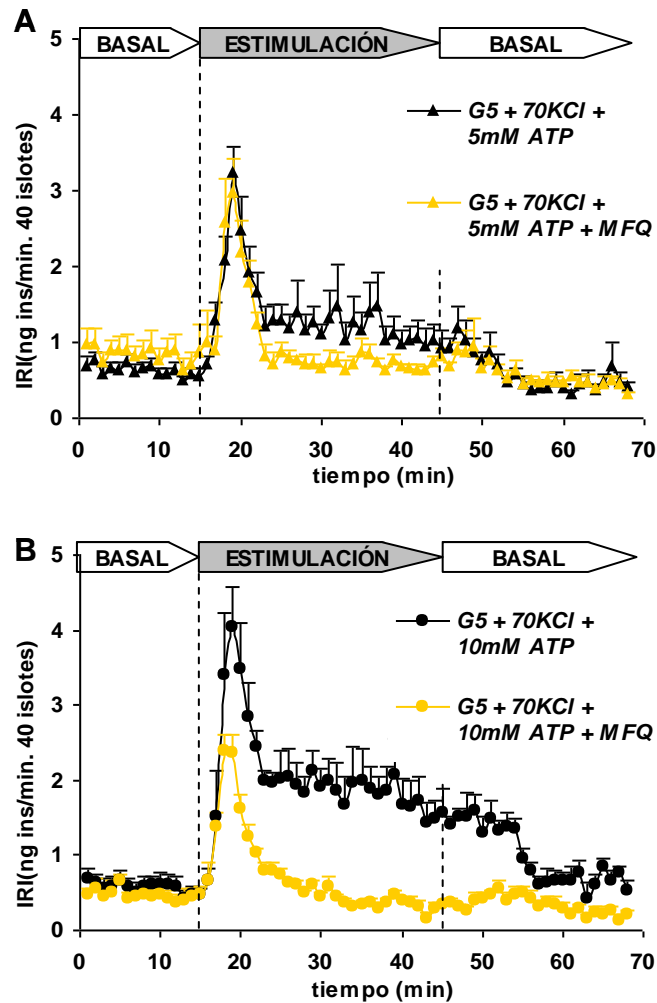


Figura 40. Efecto de la mefloquina (MFQ) sobre la secreción de insulina estimulada por 5 (A) o 10 mM (B) de ATP en condiciones depolarizantes. Grupos de 40 islotes se pre-perifunden durante 45 minutos en presencia de glucosa 5 mM (BASAL), se estimulan a continuación con G5 + KCl 70 mM + ATP 5 ó 10 mM en presencia o ausencia de mefloquina 50 μ M (ESTIMULACIÓN) durante 30 minutos y finalmente se restauran las condiciones iniciales (BASAL) durante otros 20 minutos.

	Suma de la secreción de insulina por fases (ng insulina/40 islotes)			
	G5 + 70KCl + 5mM ATP	G5 + 70KCl + 5mM ATP + MFQ	G5 + 70KCl + 10mM ATP	G5 + 70KCl + 10mM ATP + MFQ
1ª fase de secreción (10')	16.4 ± 1.7 (6)	15.1 ± 2.3 (6) ^{N.S}	22.8 ± 2.5 (5)	12.5 ± 2.5 (5)*
2ª fase de secreción (20')	27.5 ± 4.1 (5)	15.3 ± 1.4 (6)*	38.5 ± 5.8 (5)	8.9 ± 0.6 (5) [†]
Perifusión completa (70')	70.4 ± 3.9 (5)	55.2 ± 7.8 (6) ^{N.S}	92.0 ± 7.3 (5)	35.3 ± 3.8 (5) ⁺

Tabla 16. Suma de la cantidad de insulina en cada una de las fases de secreción estimulada por G5 + 70KCl + 5 ó 10 mM ATP en presencia o ausencia de mefloquina (MFQ) 50 μ M (figura 40A y 40B). Los datos se expresan como la media \pm desviación estándar y entre paréntesis el número de ensayos (n). (* $p < 0.01$, † $p < 0.001$, + $p < 0.0001$ y N.S. indican la significación estadística con respecto al valor obtenido con G5 + 70KCl + 5 ó 10 mM ATP, respectivamente, de su correspondiente fase de secreción).

3.1.2. Efecto del cociente ATP/ADP sobre la secreción de insulina estimulada por ATP extracelular en islotes “depolarizados”

Una vez comprobado que el ATP aportado extracelularmente es capaz de estimular la secreción de insulina en condiciones depolarizantes, se propuso investigar si existía una relación directa entre el aumento del cociente ATP/ADP provocado por el incremento en la captación de ATP y la secreción de insulina. Es sabido que los canales K_{ATP} son inhibidos por ATP y activados por ADP y por lo tanto estaría más implicado en su modulación el cociente ATP/ADP que la concentración absoluta de ATP. Además, un argumento en contra de la idea de que el ATP por sí sólo actúa de regulador de los canales de K_{ATP} , son las diferencias de sensibilidad de estos canales a ATP en parches de membrana aislados (rango micromolar) o en islotes intactos (rango milimolar) [117], como atestiguan nuestros resultados. La captación de ATP en islotes “depolarizados” aumentaría el cociente ATP/ADP dando lugar a una respuesta secretora y su disminución provocaría una inhibición en la secreción. Para comprobar esto, se añadió una concentración de ADP equivalente a la usada para el ATP en presencia de KCl 70 mM, lo que daría un cociente ATP/ADP igual a 1, mucho menor que el que se obtendría con la adición de ATP en ausencia de ADP. En este caso, como se observa en la figura 41, se usó una concentración de ATP y ADP de 5 mM. Los resultados mostraron que la disminución del cociente ATP/ADP redujo la segunda fase de secreción estimulada por ATP extracelular (tabla 17), lo que indica que la secreción de insulina es dependiente del cociente ATP/ADP.

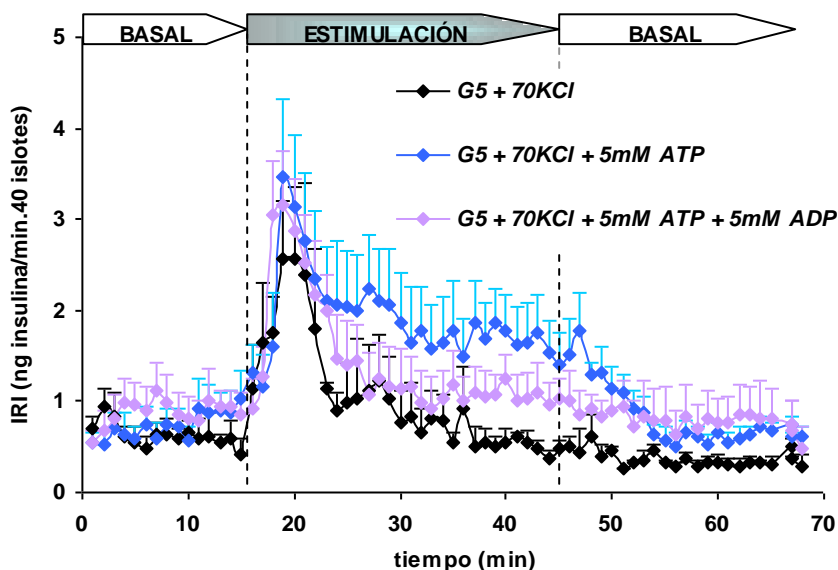


Figura 41. Efecto del cociente ATP/ADP sobre la secreción de insulina inducida por ATP 5 mM en condiciones depolarizantes (G5 + KCl 70 mM). Grupos de 40 islotes se pre-perifunden durante 45 minutos en presencia de glucosa 5 mM (BASAL), se estimulan a continuación con G5 + KCl 70 mM en presencia o ausencia de ATP 5 mM o ATP 5 mM + ADP 5 mM (ESTIMULACIÓN) durante 30 minutos y finalmente se restauran las condiciones iniciales (BASAL) durante otros 20 minutos.

Suma de la secreción de insulina por fases (ng insulina/40 islotes)			
	G5 + 70KCl	G5 + 70KCl + 5mM ATP	G5 + 70KCl + 5mM ATP + 5mM ADP
1ª fase de secreción (10')	16.3 ± 4.8 (5)	21.0 ± 4.6 (6)	20.3 ± 2.7 (6) ^{N.S}
2ª fase de secreción (20')	14.9 ± 6.2 (5)	38.6 ± 7.4 (4)	22.4 ± 3.4 (6)*
Perifusión completa (70')	49.1 ± 8.1 (5)	80.8 ± 10.4 (4)	54.4 ± 6.0 (6)**

Tabla 17. Suma de la cantidad de insulina en cada una de las fases de secreción estimulada por G5 + 70KCl en presencia o ausencia de ATP 5 mM o ATP 5 mM + ADP 5 mM (figura 41). Los datos se expresan como la media ± desviación estándar y entre paréntesis el número de ensayos (n). (* $p < 0.05$, ** $p < 0.04$ y N.S. indican la significación estadística con respecto al valor obtenido con G5 + 70KCl + 5 mM ATP de su correspondiente fase de secreción).

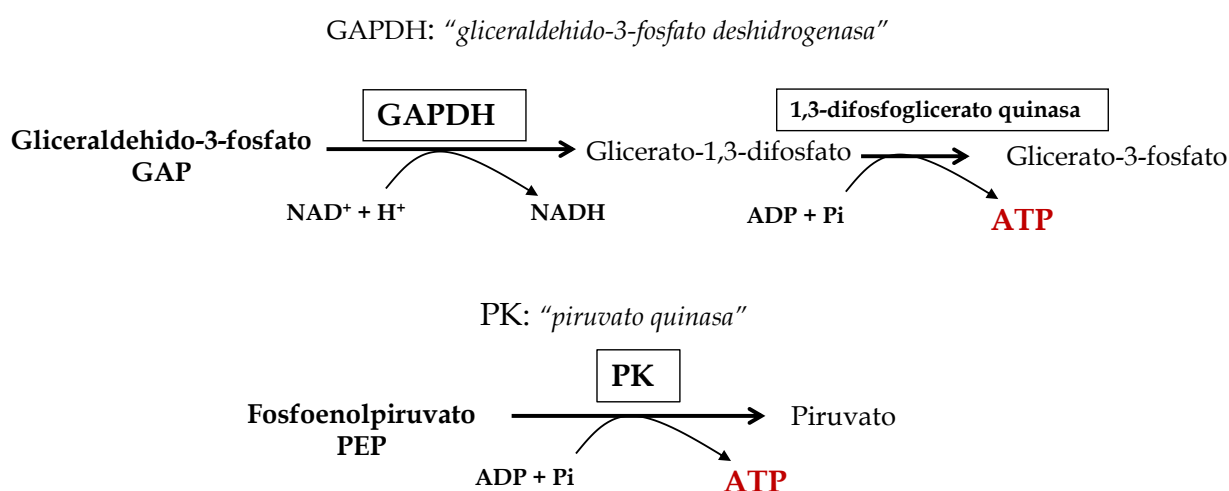
3.2. ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LA GENERACIÓN CITOSÓLICA O MITOCONDRIAL DE ATP Y LA SECRECIÓN DE INSULINA

Con el objetivo de investigar qué proceso metabólico dentro de las células β pancreáticas podría estar más ligado específicamente a la secreción de insulina, se realizó una caracterización del mecanismo de acoplamiento entre la secreción de insulina estimulada por diversos metabolitos glucolíticos o mitocondriales y la generación de ATP. Para llevar a cabo este estudio, se tomó como modelo experimental los islotes “permeabilizados” en condiciones depolarizantes. La hipótesis planteada fue que si los “hemicanales” permitían el flujo de moléculas

las de menos de 1kDa, sería posible la entrada de diversos metabolitos menores a este tamaño en estas condiciones, por lo que se podría realizar una caracterización de la secreción de insulina estimulada por diversos metabolitos y un estudio de la producción de ATP en condiciones depolarizantes.

3.2.1. Estudio de la secreción de insulina inducida por metabolitos glucolíticos

En primer lugar se quiso estudiar la secreción de insulina estimulada por los metabolitos a partir de los cuales se genera directamente ATP en la ruta glucolítica:



La exposición de los islotes a estos metabolitos se realizó en presencia de los cofactores correspondientes a cada reacción metabólica generadora de ATP. Así, se añadía ADP (10 mM) o ADP + NAD⁺ (10 mM) para el fosfoenolpiruvato (PEP) 10 mM o el gliceraldehido-3-fosfato (GAP) 10 mM, respectivamente.

Cabe destacar, como se observa en la figura 42A, que en condiciones no depolarizantes (G5), el PEP (en presencia de ADP) no incrementó la secreción de insulina que se obtenía a esta concentración de glucosa basal. Lo contrario que ocurría en condiciones depolarizantes (G5 + 70KCl), donde se observaba una respuesta secretora incrementada, sobre todo en su segunda fase. Esto indicaría que, efectivamente, la permeabilización de los islotes mediante depolarización sería una herramienta válida para estudiar la respuesta secretora de estos metabolitos. Al igual que el PEP, el GAP (en presencia de ADP y NAD⁺) en estas condiciones depolarizantes, daba lugar a una segunda fase de secreción incrementada (figura 42B).

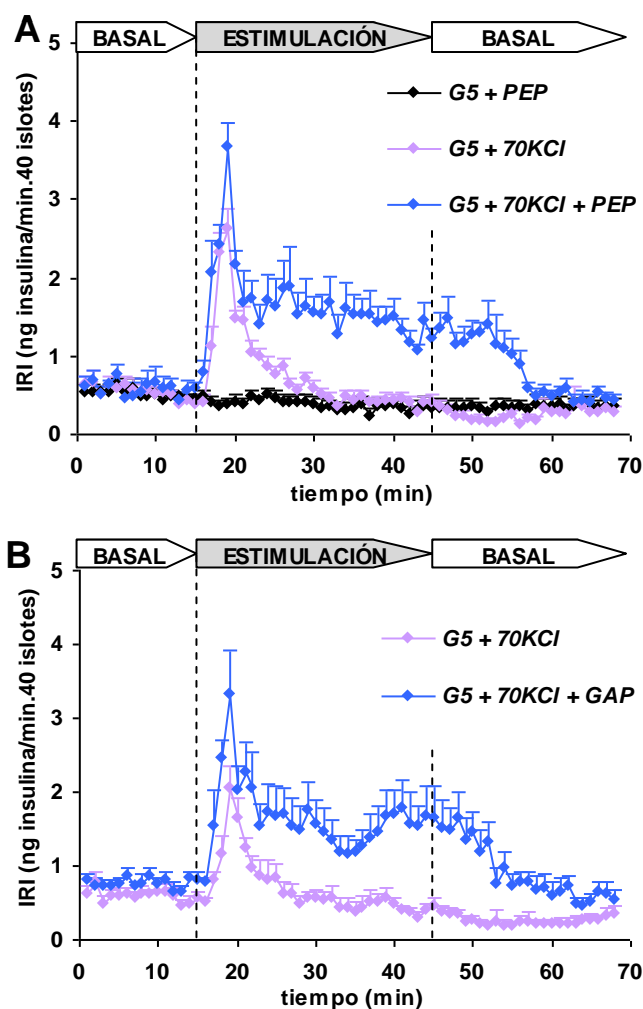


Figura 42. Secreción de insulina inducida por (A) fosfoenolpiruvato (PEP) 10 mM (+ADP 10 mM) o (B) gliceraldehído-3-fosfato (GAP) 10 mM (+ ADP y NAD^+ 10 mM) en condiciones depolarizantes (G5 + KCl 70 mM). Grupos de 40 islotes se pre-perifunden durante 45 minutos en presencia de glucosa 5 mM (BASAL), se estimulan a continuación con G5 + KCl 70mM en presencia o ausencia de PEP o GAP (ESTIMULACIÓN) durante 30 minutos y finalmente se restauran las condiciones iniciales (BASAL) durante otros 20 minutos. Los experimentos se llevaron a cabo en presencia de los cofactores correspondientes para cada metabolito usado. Así, se usó ADP 10 mM o ADP 10 mM + NAD^+ 10 mM para el PEP o el GAP, respectivamente.

Por tanto, el metabolismo de estas sustancias sería el responsable de la secreción de insulina. Sin embargo, no podíamos distinguir qué proceso metabólico estaría más ligado a esta respuesta: o bien la propia reacción glucolítica que genera ATP citosólico por fosforilación ligada al sustrato o bien la oxidación mitocondrial mediante la síntesis de ATP en la fosforilación oxidativa. Para ello, se realizaron diversos ensayos en presencia de inhibidores de las enzimas que catalizan las reacciones glucolíticas así como de inhibidores de la producción de ATP a nivel mitocondrial. Tal y como se muestra en las figuras 43 y 44, la presencia de rotenona 10 μM (inhibidor del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial) no modificó la secreción de insulina estimulada por PEP o GAP, mientras que la fenilalanina 15 mM (inhibidor de la PK, [118]) o el iodoacetato 0.5 mM (inhibidor de la GAPDH), sí que disminuyeron significativamente la segunda fase de la respuesta.

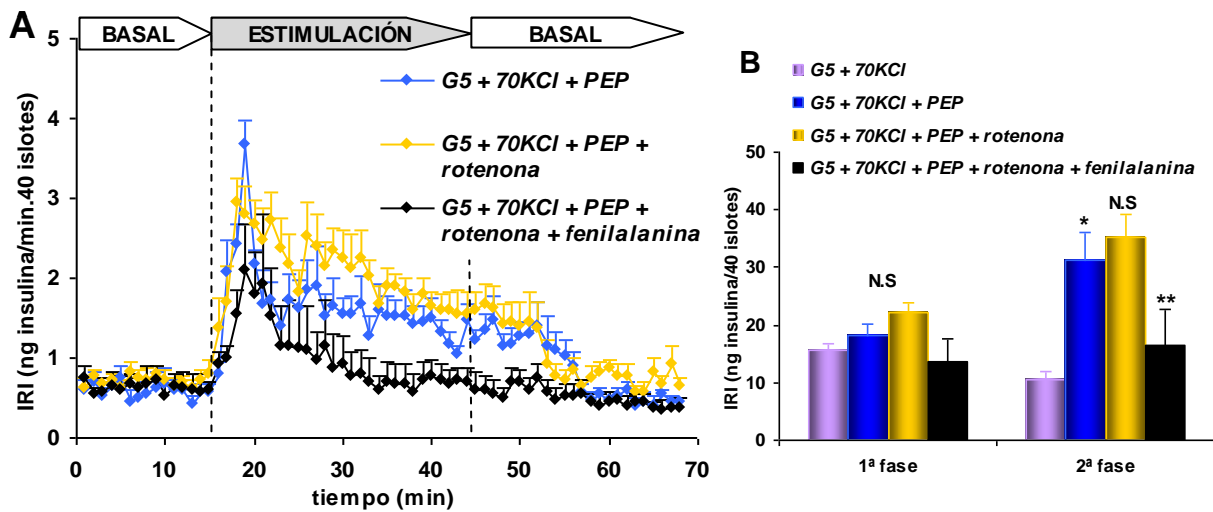


Figura 43. (A) Efecto de la fenilalanina y/o rotenona en la secreción de insulina inducida por fosfoenolpiruvato (PEP) 10 mM (+ADP 10 mM) en condiciones depolarizantes (G5 + KCl 70 mM). Grupos de 40 islotes se pre-perifunden durante 45 minutos en presencia de glucosa 5mM (BASAL), se estimulan a continuación con G5 + KCl 70 mM en presencia o ausencia de PEP \pm rotenona 10 μ M \pm fenilalanina 15 mM (ESTIMULACIÓN) durante 30 minutos y finalmente se restauran las condiciones iniciales (BASAL) durante otros 20 minutos. (B) Suma de la cantidad de insulina secretada en cada una de las fases de secreción (1ª y 2ª fase). (* $p < 0.001$ indica la significación estadística con respecto al valor con G5 + 70KCl y * $p < 0.03$ y N.S. con respecto al valor con G5 + 70KCl + PEP).

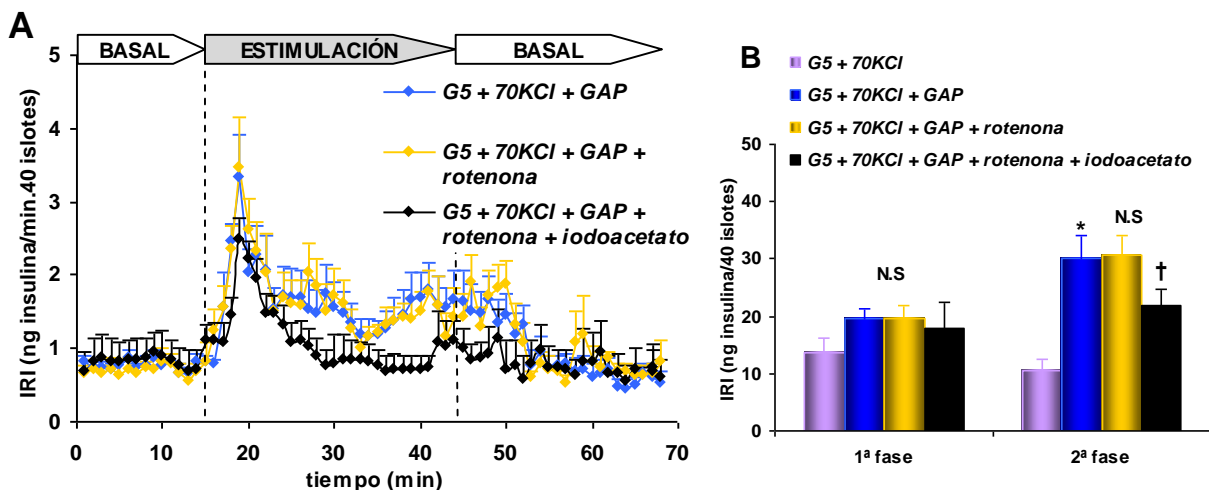


Figura 44. (A) Efecto del iodoacetato y/o rotenona en la secreción de insulina inducida por gliceraldehído-3-fosfato (GAP) 10 mM (+ ADP y NAD^+ 10 mM) en condiciones depolarizantes (G5 + KCl 70 mM). Grupos de 40 islotes se pre-perifunden durante 45 minutos en presencia de glucosa 5 mM (BASAL), se estimulan a continuación con G5 + KCl 70 mM en presencia o ausencia de GAP \pm rotenona 10 μ M \pm iodoacetato 0.5 mM (ESTIMULACIÓN) durante 30 minutos y finalmente se restauran las condiciones iniciales (BASAL) durante otros 20 minutos. (B) Suma de la cantidad de insulina secretada en cada una de las fases de secreción (1ª y 2ª fase). (* $p < 0.001$, indica la significación estadística con respecto al valor con G5 + 70KCl y † $p < 0.05$ y N.S. con respecto al valor con G5 + 70KCl + GAP).

Por otra parte, se comprobó si un metabolito de las primeras etapas de la ruta glucolítica como es la glucosa-6-fosfato (G6P), podría dar lugar a una respuesta secretora en estas condiciones depolarizantes. Ya que la generación directa de ATP no tiene lugar hasta la reacción catalizada por la GAPDH + 1,3-difosfoglicerato quinasa, para estos ensayos también se incluyeron los cofactores necesarios: ADP y el NAD⁺.

Como se muestra en las figuras 45A y 45C, la G6P 10 mM en condiciones depolarizantes dio lugar a una segunda fase de secreción incrementada que no se vio modificada por la presencia de fenilalanina, lo que indica que el bloqueo de la glucólisis a nivel de la PK no influiría en esta respuesta secretora. Además, la inhibición de la producción de ATP a nivel mitocondrial con rotenona, tampoco modificó esta secreción. Sin embargo, sorprendentemente, otro inhibidor de la cadena respiratoria de electrones como es la antimicina A (10 μ M), pero en este caso del complejo III, sí que bloqueó parcialmente esta respuesta (figuras 45B y 45C).

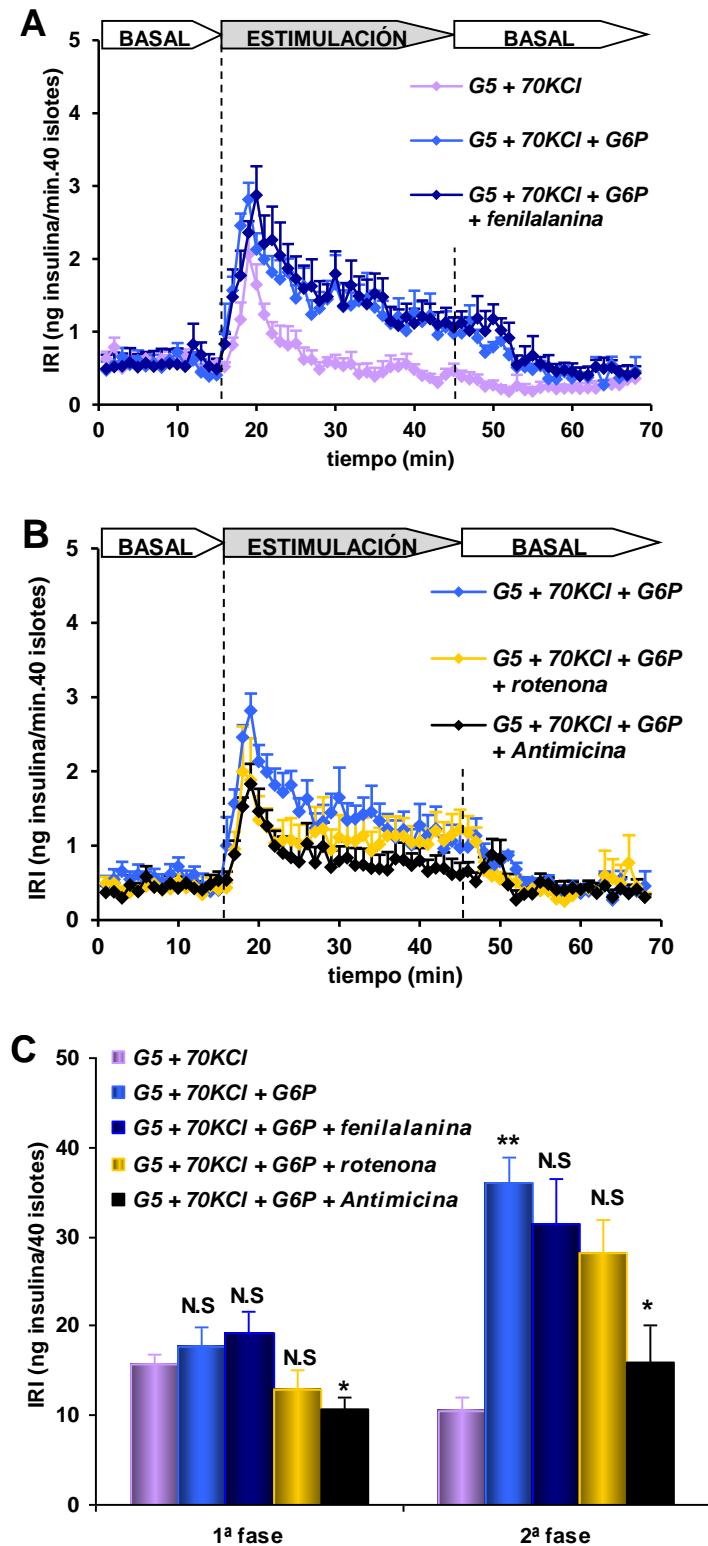


Figura 45. Efecto de la fenilalanina (A) o la rotenona/Antimicina A (B) en la secreción de insulina inducida por glucosa-6-fosfato (G6P) 10 mM (+ ADP y NAD⁺ 10 mM) en condiciones depolarizantes (G5 + KCl 70 mM). Grupos de 40 islotes se pre-perifunden durante 45 minutos en presencia de glucosa 5mM (BASAL), se estimulan a continuación con G5 + KCl 70 mM en presencia o ausencia de G6P 10 mM ± fenilalanina 15 mM ± rotenona o antimicina A 10 μM (ESTIMULACIÓN) durante 30 minutos y finalmente se restauran las condiciones iniciales (BASAL) durante otros 20 minutos. (C) Suma de la cantidad de insulina secretada en cada una de las fases de secreción (1ª y 2ª fase). (***p*<0.0001 indica la significación estadística con respecto al valor con G5 + 70KCl y **p*<0.02 y N.S con respecto al valor con G5 + 70KCl + G6P).

3.2.2. Estudio de la secreción de insulina inducida por metabolitos mitocondriales

De la misma forma que se investigó la respuesta secretora de determinados metabolitos glucolíticos, se comprobó cómo respondían ciertos metabolitos a partir de los cuáles se produce el ATP a nivel mitocondrial, como el piruvato o el succinato. En este caso, también se usaron los cofactores necesarios para cada uno: ADP y ADP + NADP⁺ para el piruvato (PIR) y el succinato (SUCC), respectivamente.

La “permeabilización” de los islotes mediante depolarización nos sirvió de nuevo de modelo para estudiar la respuesta de estos metabolitos ya que, como se observa en la figura 46A, en condiciones no depolarizantes (G5) el PIR 10 mM no incrementó la secreción de insulina. No obstante, en condiciones depolarizantes (G5 + KCl 70 mM), sólo aumentó ligeramente esta respuesta secretora en su segunda fase (figura 46B). Sin embargo, otro metabolito mitocondrial como es el succinato, sí que aumentó significativamente esta secreción, siendo bloqueada parcialmente por un inhibidor de la succínico deshidrogenasa que cataliza su metabolismo como es el malonato (10mM) (figuras 47A y 47B).

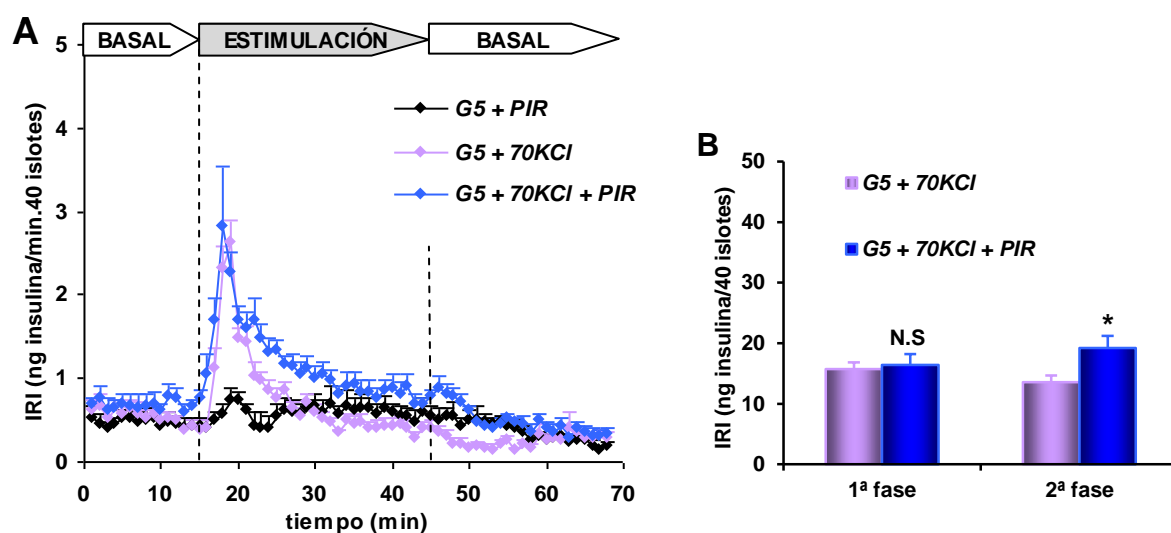


Figura 46. (A) Secreción de insulina inducida por piruvato (PIR) 10 mM (+ ADP 10 mM) en condiciones depolarizantes (G5 + KCl 70mM) o no depolarizantes (G5). Grupos de 40 islotes se pre-perifunden durante 45 minutos en presencia de glucosa 5 mM (BASAL), se estimulan a continuación con G5 + KCl 70 mM en presencia o ausencia de PIR o G5 + PIR (ESTIMULACIÓN) durante 30 minutos y finalmente se restauran las condiciones iniciales (BASAL) durante otros 20 minutos. (B) Suma de la cantidad de insulina para cada fase de secreción (1ª y 2ª fase). (* $p < 0.05$ y N.S. indican la significación estadística con respecto al valor con G5 + 70KCl).

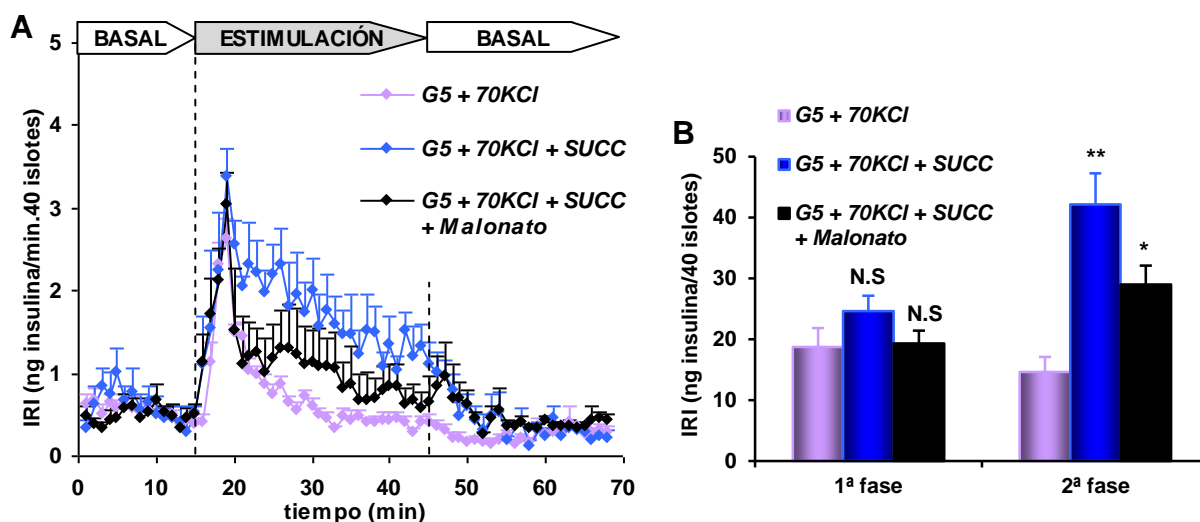


Figura 47. (A) Efecto del Malonato en la secreción de insulina inducida por succinato (SUCC) 10 mM (+ADP y +NADP⁺ 10 mM) en condiciones depolarizantes (G5 + KCl 70 mM). Grupos de 40 islotes se pre-perifunden durante 45 minutos en presencia de glucosa 5 mM (BASAL), se estimulan a continuación con G5 + KCl 70mM en presencia o ausencia de SUCC 10 mM ± Malonato 10mM (ESTIMULACIÓN) durante 30 minutos y finalmente se restauran las condiciones iniciales (BASAL) durante otros 20 minutos. **(B)** Suma de la cantidad de insulina para cada fase de secreción (1ª y 2ª fase). (** $p < 0.002$ y N.S. (no significativo) indican la significación estadística con respecto al valor con G5 + 70KCl y * $p < 0.05$ con respecto al valor con G5 + 70KCl + SUCC).

3.2.3. Producción de ATP inducida por metabolitos glucolíticos o mitocondriales

Con el objetivo de comparar la producción de ATP con la secreción de insulina estimulada por estos metabolitos, se midió la cantidad de ATP en los islotes y en el medio de incubación en condiciones depolarizantes en presencia de G6P, GAP, PEP, PIR o SUCC (10 mM) y en las mismas condiciones que los ensayos de secreción (con los cofactores correspondientes).

Como se observa en la tabla 18A, la generación de ATP en condiciones no depolarizantes (G5) en presencia de PEP o PIR no aumentó con respecto al ATP producido por una concentración de glucosa basal. Sin embargo, en condiciones depolarizantes (G5 + KCl 70 mM) los niveles de ATP producidos por los metabolitos fue similar al generado por una concentración de glucosa estimulante (G20). Lo que indicaría de nuevo la validez del modelo de “permeabilización” de los islotes inducido por depolarización.

En estas condiciones, la inhibición de la producción de ATP a nivel mitocondrial (complejo I cadena respiratoria) con rotenona 10 μ M disminuyó significativamente el contenido de ATP generado por los metabolitos glucolíticos (G6P, GAP y PEP), mientras que la antimicina A (inhibidor complejo III cadena respiratoria) lo hizo sobre el ATP producido por G6P y

PIR. Además, la inhibición a nivel de la glucólisis con fenilalanina (inhibidor de la PK) y del ciclo de Krebs con malonato bloqueó el aumento de ATP por PEP y SUCC, respectivamente.

La aparente discordancia entre el fuerte descenso del contenido de ATP de los islotes producido por rotenona y su incapacidad para inhibir la secreción inducida por G6P y PEP, indujo a pensar que la generación citosólica de ATP podría ser más relevante que la mitocondrial para la estimulación de la respuesta insulínica. Dado que el ATP citosólico es probablemente más fácilmente intercambiable con el medio de incubación en islotes “depolarizados” a través de los “hemicanales” supuestamente abiertos, se estudió en paralelo al contenido insular, la acumulación extracelular de ATP inducida por los metabolitos ensayados.

En islotes “depolarizados” con KCl, la incubación con los metabolitos (glucolíticos o mitocondriales) produjo una gran acumulación de ATP en el medio extracelular (nmoles) que resultó ser 1000 veces mayor que el contenido insular (pmoles), a pesar de la existencia de altas actividades ecto-nucleotidasas en la membrana celular. Esta acumulación sería debida a la salida pasiva de ATP generado en las reacciones intracelulares sustentadas por los diferentes metabolitos. La facilidad con la que este nucleótido se intercambia con el medio, parece sugerir que su procedencia sea principalmente citosólica. Reforzando esta idea, se comprobó que la rotenona no modificaba la acumulación extracelular de ATP inducida por los metabolitos glucolíticos (G6P, GAP y PEP) (tabla 18B), a pesar de inhibir fuertemente el contenido de los islotes (tabla 18A). Sin embargo, la fenilalanina, inhibidor de la PK [118] y por tanto de la síntesis de ATP y piruvato en la ruta glucolítica, bloqueó tanto el contenido de ATP como su acumulación extracelular (tablas 18A y 18B). Se podría pensar que la fenilalanina, al inhibir la fosforilación ligada al sustrato y por lo tanto la síntesis de piruvato, llevaría el contenido de ATP de los islotes hasta niveles cercanos a los obtenidos en islotes no “depolarizados” e incubados con G5 (tabla 18A).

Por otra parte, el PIR indujo una acumulación extracelular de ATP significativamente menor que el PEP (tabla 18B), lo que probablemente podría explicar su baja capacidad insulinotrópica. Algunos autores denominan como la “paradoja” del piruvato a la discrepancia entre su elevado grado de oxidación y la incapacidad de estimular la secreción de insulina [17, 150] (véase apartado de Discusión).

Finalmente, la producción de ATP por SUCC fue inhibida por un inhibidor competitivo de la succínico deshidrogenasa como es el malonato, tanto el contenido insular como la acumulación extracelular (tablas 18A y 18B). En este caso, la acumulación extracelular de ATP

podría proceder del intercambio del metabolito entre la mitocondria y el citosol. Se ha descrito un modelo en el que la generación de PEP en la mitocondria podría entrar en un ciclo (ciclo del PEP [152]) en el que se exportaría al citosol y produciría ATP en la reacción de la PK. La formación indirecta de PEP a partir de succínico y su salida al citosol podría contribuir a la acumulación extracelular del nucleótido.

ATP _{ISLOTES}	
G5 (picomoles ATP/ islote)	
PEP	PIR
2.28 ± 0.20 (6)	2.70 ± 0.3 (5)

A

ATP _{ISLOTES}					
G5 + 70KCl (picomoles ATP/ islote)					
	G6P	GAP	PEP	SUCC	PIR
	4.89 ± 0.68 (4)	4.29 ± 0.60 (5)	5.18 ± 0.73 (5)	4.23 ± 0.55 (4)	4.60 ± 0.55 (5)
+ rotenona	1.83 ± 0.43 (5) [†]	1.05 ± 0.11 (5) [‡]	1.76 ± 0.21 (5) [†]	-	-
+ Antimicina	1.73 ± 0.23 (5) [†]	-	-	-	1.65 ± 0.17 (6) [‡]
+ fenilalanina	-	-	2.24 ± 0.52 (4) ^{**}	-	-
+ malonato	-	-	-	2.47 ± 0.45 (4) ^{**}	-

ATP _{MEDIO}	
G5 (nanomoles ATP/ islote)	
PEP	PIR
5.7 × 10 ⁻³ ± 0.003 (5)	6.8 × 10 ⁻³ ± 0.02 (5)

B

G5 + 70KCl (nmol ATP/ islote)					
	G6P	GAP	PEP	SUCC	PIR
	5.13 ± 0.56 (5)	6.09 ± 1.04 (5)	5.40 ± 0.47 (5)	4.96 ± 0.38 (4)	3.62 ± 0.42 (5) ^{**}
+ rotenona	4.46 ± 0.66 (5) ^{N.S}	5.87 ± 0.08 (5) ^{N.S}	5.47 ± 0.71 (5) ^{N.S}	-	-
+ Antimicina	3.07 ± 0.11 (5) [*]	-	-	-	-
+ fenilalanina	4.87 ± 0.87 (5) ^{N.S}	-	3.23 ± 0.36 (5) [*]	-	-
+ malonato	-	-	-	3.14 ± 0.46 (5) ^{**}	-

Tabla 18. Efecto de inhibidores glucolíticos y mitocondriales en el contenido de ATP de los islotes (A) o del medio (B) en condiciones basales (G5) o depolarizantes (G5 + 70KCl). Islotes expuestos a G5 en presencia de fosfoenolpiruvato (PEP) o piruvato (PIR) 10 mM o G5 + KCl 70 mM en presencia de glucosa-6-fosfato (G6P) ± rotenona/Antimicina A 10 μM o fenilalanina 15 mM, gliceraldehido-3-fosfato (GAP) ± rotenona 10 μM, fosfoenolpiruvato (PEP) ± rotenona 10 μM ± fenilalanina 15 mM, succinato (SUCC) ± malonato 10 mM o piruvato (PIR) 10 mM ± Antimicina A 10 μM. Los datos se expresan como la media ± desviación estándar y entre paréntesis el número de ensayos (n). [^{*}p<0.01, ^{**}p<0.02, [†]p<0.005, [‡]p<0.002, [‡]p<0.001 y N.S. indican la significación estadística con respecto al control (G5 + 70KCl + metabolito en ausencia de inhibidor) correspondiente]. El contenido de ATP en el medio obtenido con PIR es significativamente menor (^{**}p<0.02) que el del PEP.

DISCUSIÓN

1. IMPORTANCIA FUNCIONAL DE LA COMUNICACIÓN CELULAR EN ISLOTES

Ha sido demostrado durante muchos años que una comunicación intercelular dentro de los islotes pancreáticos que permita el acoplamiento entre las células tanto eléctrico como químico, es una condición indispensable para que tenga lugar una respuesta óptima de insulina [69, 87, 88, 94]. Por eso, el estudio de los mecanismos de sincronización celular y su importancia en el mecanismo de secreción de insulina ha sido un tema abordado por muchos autores a lo largo de estos años.

En este trabajo nos hemos centrado en el estudio funcional de los “hemicanales” en el flujo de determinadas moléculas (aminoácidos y nucleótidos de adenina) en las células β pancreáticas y su implicación en el mecanismo de secreción de insulina, así como en la importancia de la comunicación intercelular (canales “*gap junctions*”) en dicha respuesta secretora.

En estudios realizados en nuestro laboratorio se ha observado que la exposición de islotes pancreáticos de rata a un medio con glucosa basal (5 mM) (G5) en ausencia de Ca^{2+} provocaba una liberación de GABA y taurina que fue incrementada por una depolarización simultánea con KCl 70 mM y acompañada de una liberación adicional de Glu y Asp. La ausencia de Ca^{2+} extracelular apoyaba la idea de que la liberación de estos aminoácidos no fuera mediante un incremento de exocitosis de vesículas, ya que es sabido que para la liberación por exocitosis es necesaria la presencia del catión divalente [119]. Por otra parte, se ha demostrado que una depolarización con KCl induce una secreción de insulina de tipo monofásico a una concentración fisiológica de Ca^{2+} , en contraste con la típica secreción bifásica inducida por una concentración de glucosa estimuladora (20 mM). Sin embargo, a pesar de que en estas condiciones habría un incremento de la exocitosis de vesículas secretoras, ha sido publicado por nuestro grupo que la glucosa 20 mM (G20) no sólo no incrementaba la liberación de aminoácidos como lo hacía el KCl, sino que la reducía [120]; cómo también se muestra en un trabajo publicado anteriormente por el grupo de Wang C. y cols [121]. Estas diferencias encontradas reforzaban la idea de que la liberación de los aminoácidos debida a la depolarización con KCl en presencia o ausencia de Ca^{2+} no estaría causada por exocitosis.

Además, en experimentos previos hemos observado que una pre-exposición de los islotes de rata a una depolarización con KCl 70 mM suprimía la estimulación de la secreción de insulina por G20 [120], siendo también observado en otro trabajo en islotes de ratón [34]. No obstante, también se ha visto que la secreción inducida por otro nutriente secretagogo como

es el KIC fue suprimida por KCl 70 mM [30]. Ya que había sido demostrado además que la estimulación de la secreción por G20 o KIC podría depender del metabolismo de GABA y que una depolarización elevada inducía una liberación de este aminoácido [30, 120, 122], nos hizo pensar que la pérdida del GABA podría ser el motivo del efecto del KCl sobre la secreción. Posteriormente, hemos observado que esta depolarización (en presencia o ausencia de Ca^{2+}) inducía también una disminución del contenido de ATP de los islotes, lo que podría sugerir que esta pérdida, incrementada además gradualmente a concentraciones de KCl de 15 a 70 mM, fuera también la responsable del efecto inhibitor del KCl.

Por lo tanto, descartando que la liberación de aminoácidos y ATP fuera mediante un mecanismo de exocitosis de vesículas y por analogía con lo sucedido en células del sistema nervioso [83, 123], se planteó la hipótesis de que esta pérdida tanto de aminoácidos como de ATP podría ser debida a la apertura en la membrana plasmática de “hemicanales” (conexonas) formadas por Cxs o Pxs [77], las cuáles permitirían el paso de moléculas con un peso molecular inferior a 1kDa [79]. Sin embargo, según nuestros resultados, la MFQ (inhibidor de Cx36 y Cx50) bloqueó parcialmente la pérdida de estas moléculas provocada por depolarización, mientras que la CBX (inhibidor de Pxs) no. Además, un agonista del receptor purinérgico P2X7, como es el benzoil-ATP, que induce la apertura de Pxs [124], no provocó ninguna liberación de ATP (resultados no mostrados). Incluso un antagonista de canales de Cl^- como es el NPPB [125] tampoco bloqueó la pérdida de aminoácidos inducida por KCl, lo que descartaba la posibilidad de la liberación por estos canales. Todos estos resultados apuntaban por tanto a que la liberación de ATP o aminoácidos podría ser a través de canales formados por Cxs no acoplados a otros canales de otra célula vecina (“hemicanales”), como ya ha sido demostrado en otros tejidos [82, 126, 127]. La alta especificidad de la MFQ para la inhibición de la isoforma de 36 kDa de Cxs [111] y que esta isoforma es la predominante en las células β pancreáticas [94, 95], sugieren el importante papel que juega la Cx36 en la comunicación intercelular en los islotes pancreáticos.

Se ha comprobado también que esta pérdida de ATP puede ser reversible, ya que la exposición a ATP extracelular en condiciones depolarizantes, aumentaba el contenido de ATP de los islotes de manera dosis-dependiente. Esta captación estaba parcialmente bloqueada por MFQ y por ácido flufenámico, pero no por CBX [83] o NPPB, lo que sugería la existencia de una permeoselectividad de estos canales formados por Cxs que pudiera estar implicada en mecanismos de regulación de la secreción de insulina. Esta permeabilidad a ciertas molé-

culas citosólicas también ha sido demostrada en otros tipos celulares, incluso para colorantes aportados exógenamente [81].

Sin embargo, además de bloquear parcialmente la pérdida y captación de ATP en condiciones depolarizantes, la MFQ ejerció un efecto inhibitorio de manera dosis-dependiente (hasta una concentración de 50 μM) sobre la secreción de insulina estimulada por G20, KIC o SSA. Según estos resultados, la MFQ estaría bloqueando tanto los “hemicanales” como los canales intercelulares (“*gap junctions*”). Este efecto fue parcialmente confirmado en ratones transgénicos que tenían silenciado el gen de la Cx36 y en los que la respuesta secretora a glucosa estaba disminuida, recalando por tanto la importancia de la comunicación intercelular a través de estos canales en el mecanismo de secreción de insulina [87].

Por otra parte, dos nutrientes secretagogos como son el KIC y el SSA fueron capaces de elevar el contenido de ATP de los islotes y el cociente ATP/ADP a niveles similares a los generados por G20. Sin embargo, sorprendentemente, una depolarización con KCl 70 mM (con omisión de Ca^{2+}) no afectó al contenido de ATP en presencia de G20, al contrario que en el caso del KIC o el SSA, en los que no existía una recuperación completa de esta pérdida. Como se ha comentado anteriormente, la secreción de insulina estimulada por KIC se vio casi completamente inhibida por KCl aportado simultáneamente [30] y fuertemente bloqueada en el caso de la G20 sólo cuando se realizaba una exposición previa con KCl [120]. *Hatlapka y cols* mostraron que la depolarización con KCl 15 mM alcanza los niveles de potencial de membrana similares a los conseguidos por el cierre de los canales K_{ATP} . Con KCl 30 mM (40 mM en ratón) se alcanzaría una magnitud de depolarización correspondiente a concentraciones elevadas de glucosa, no observándose una modificación en el contenido de ATP ni ADP de los islotes, pero sí una disminución en el cociente ATP/ADP. Los autores argumentan que esto sería debido a una inhibición de la fosforilación oxidativa, aunque no lo demuestran [34]. Sin embargo, en nuestros resultados observamos que la disminución del contenido de ATP observada con KCl 15, 30 ó 70 mM de los islotes no se acompaña de una modificación del cociente ATP/ADP, lo que apoya la idea de que la pérdida de ATP no es debida a una modificación en el potencial de fosforilación, sino que estaría determinada por un incremento en la liberación de ambos nucleótidos de adenina.

Por lo tanto, estos datos sugieren que la glucosa a altas concentraciones podría tener un componente no metabólico que, a través posiblemente del cierre de los “hemicanales”, protegería de la pérdida de ATP y contribuiría a mantener los niveles de ATP intracelulares que permitieran una secreción de insulina prolongada.

Este efecto de G20 fue además parcialmente reproducido por análogos estructurales no metabolizables o pobremente metabolizables como la L-glucosa, la 3-o-metil-D-glucosa o la D-galactosa (15 mM), los cuales restauraban el contenido de ATP hasta niveles cercanos a los conseguidos con una concentración de glucosa basal (G5) en islotes no depolarizados, volviendo a confirmar el posible efecto de G20 no dependiente del metabolismo sobre la pérdida de ATP inducida por depolarización. Este efecto podría otorgar a la glucosa un posible papel fisiológico en la regulación de la actividad de los hemicanales formados por Cx36 en las células β y su implicación en la secreción de insulina.

En general, todos los efectos de la depolarización con KCl 70 mM observados en los islotes pancreáticos de rata, fueron reproducidos en islotes de ratón:

Una exposición de estos islotes a condiciones depolarizantes en presencia de glucosa basal (G5 + KCl 70 mM) disminuyó el contenido de taurina a la vez que aumentó su liberación. Una característica diferencial de estos islotes de ratón con los de rata es el extremadamente bajo contenido de GABA, probablemente debido a la pobre expresión en estos islotes de la isoforma de 65 kDa de la "ácido glutámico descarboxilasa" (GAD65), enzima productora de GABA [128]. Además, según los resultados obtenidos en los ensayos con islotes de rata, la taurina parece ser un aminoácido metabólicamente inerte, ya que no se modifica bajo circunstancias estimulantes de la secreción de insulina, por lo que sería un buen marcador de cambios en la permeabilidad de la membrana.

Además, el KCl 70 mM indujo una disminución en el contenido de ATP de los islotes que fue prevenida parcial o totalmente por MFQ o G20, respectivamente. Efecto también reproducido parcialmente por los análogos de glucosa anteriormente descritos. La captación de ATP también fue demostrada en islotes expuestos a ATP extracelular (5 mM) en condiciones depolarizantes. Por lo tanto, estos resultados parecían confirmar la idea de que la depolarización con KCl 70 mM provocaba la apertura de los "hemicanales" de Cx36 y por consiguiente la pérdida de ATP y aminoácidos.

Con objeto de verificar esta hipótesis, se estudiaron los efectos de una delección del gen que codifica para la Cx36 [de un alelo, Cx36^{+/-} (heterocigotos) o de los dos alelos, Cx36^{-/-} (homocigotos)] sobre el contenido de ATP y aminoácidos y la secreción de insulina estimulada por glucosa en este modelo animal.

Se comprobó que una delección completa de la Cx36 suprimía completamente tanto la liberación como la captación de ATP inducida por KCl 70 mM, ya que en estos islotes Cx36^{-/-}

el contenido de ATP en condiciones depolarizantes no fue modificado con respecto al ATP en condiciones basales no depolarizantes. Estos datos serían similares a los obtenidos en células del sistema nervioso, donde un bloqueo parcial de la expresión de la Cx36 (por silenciamiento del gen) o la inhibición con bloqueantes específicos (flufenámico o derivados de la quinina) reducía la cantidad de ATP liberado durante una depolarización con KCl 100 mM [83]. Por ello, debido a las características similares encontradas entre estos tipos celulares, podría sugerirse de nuevo la importante implicación de los “hemicanales” en el flujo de ATP en las células β pancreáticas. Incluso se ha observado que la expresión de Cxs en otras líneas celulares (C6 del glioma, HeLa o U373 del glioblastoma) potenciaba la liberación de ATP al exterior [129]. Además, en los islotes Cx36^{+/-} (delección de un solo alelo) se observó que los valores de ATP en presencia de KCl eran intermedios con respecto a los obtenidos en los islotes Cx36^{+/+} y Cx36^{-/-}, por lo que el intercambio de ATP con el medio extracelular dependería también del grado de expresión de la Cx36 y por lo tanto del número de “hemicanales” formados.

Sin embargo, a día de hoy la existencia de “hemicanales” funcionales en células β es un tema controvertido. De hecho, *Scemes y cols* sugieren que no hay evidencias de funcionalidad de este tipo de canales en células MIN6 (productoras de insulina) o en islotes de ratón, ya que observan que no hay una captación de un marcador catiónico como es el bromuro de etidio en ausencia de Ca²⁺ y que la liberación de ATP en las MIN6 es de forma exocitótica [96]. Estas discrepancias podrían deberse a la posible diferente permeabilidad de estos “hemicanales” para moléculas catiónicas (bromuro de etidio, 1 carga positiva) o aniónicas (ATP, 4 cargas negativas). Además, en este trabajo los autores no comprueban si la ausencia de Ca²⁺ provoca una pérdida de ATP. En este sentido, en experimentos realizados recientemente (resultados no mostrados) se ha estudiado la liberación de ATP en un contexto diferente a las células β , como son los oocitos de *Xenopus Laevis*, en los cuales se expresaban distintas isoformas de Cxs. Los oocitos que expresaban la Cx36 perdían ATP en ausencia de Ca²⁺ con o sin KCl 70 mM y mantenían la sensibilidad de ser bloqueados por G20 y MFQ, indicando una posible funcionalidad de estos canales en este tipo celular.

Para intentar corroborar la posible funcionalidad de los “hemicanales” en un entorno más directo en el que no existiría la posibilidad de una comunicación intercelular, se estudió el efecto de la depolarización en células aisladas de islotes y en células INS-1 (productoras de insulina). Tras la expresión de la luciferasa en las células [130], se expusieron a determinadas concentraciones de luciferina en condiciones o no depolarizantes en presencia de G20, MFQ

o CBX. Observamos que la depolarización aumentaba, de manera dosis-dependiente de luciferina, la luminiscencia de las células, siendo parcialmente bloqueado este efecto por G20 y MFQ pero no por CBX en las células aisladas de islotes y sólo por MFQ en las células INS-1, posiblemente por la diferente sensibilidad a G20. La demostrada permeabilidad de estos canales a moléculas de menor tamaño de 1 kDa [84], permitiría la entrada de la luciferina y la emisión de luz por reacción con el ATP intracelular en presencia de luciferasa. Además, la exposición a una concentración de ATP 3 mM provocaba un aumento todavía mayor de esta señal luminiscente, bloqueada de nuevo por MFQ y G20.

Estos resultados, junto con los obtenidos anteriormente en islotes intactos, reforzarían la idea de la posible existencia de "hemicanales" funcionales en estas células que estarían implicados en el intercambio de moléculas citosólicas con el exterior y que pudieran ser importantes en mecanismos de señalización de la función celular.

Por otra parte, ha sido ampliamente demostrado que la comunicación intercelular en las regiones "gap junctions" de células β es esencial para que tenga lugar una secreción de insulina normal y que la Cx36 es la principal proteína formadora de estos canales [89, 94, 95, 101, 102]. En nuestros ensayos, los islotes Cx36^{-/-} mostraron una secreción basal de insulina y una primera y segunda fase estimulada por G20 fuertemente disminuida con respecto a la respuesta secretora de los islotes Cx36^{+/+}. En este tema existe todavía cierta controversia, ya que en trabajos publicados previamente, se observaba que la secreción basal de insulina en islotes Cx36^{-/-} era significativamente mayor que la de los Cx36^{+/+} y la primera fase de secreción a concentraciones estimulantes de G20 no se veía afectada [97, 131]. Sin embargo, en un reciente estudio se ha demostrado que la secreción basal no estaba modificada en islotes Cx36^{-/-} y que la primera fase sí que era menor que en los islotes control [102], coincidiendo estos resultados parcialmente con los obtenidos en nuestro trabajo. Estas discrepancias podrían ser debidas a las posibles diferencias en cuanto a la metodología usada en los ensayos, ya que incluso la magnitud de la respuesta secretora de los islotes control es menor en los trabajos indicados que en nuestros ensayos.

Además, los islotes Cx36^{+/-} mostraron una secreción intermedia a la observada en los Cx36^{-/-} y Cx36^{+/+}, lo que indica que una expresión suficiente de esta proteína y la formación de los canales intercelulares sería necesaria para que tenga lugar una respuesta secretora a glucosa. Incluso los efectos de la delección de la Cx36 en la secreción de insulina fueron parcialmente reproducidos por MFQ.

La disminución de la secreción de insulina que muestran los islotes Cx36^{-/-} en nuestros ensayos sería compatible con la intolerancia a la glucosa que sufren los ratones KO-Cx36 observada en el trabajo de *Head y cols*: los ratones Cx36^{+/-}, a pesar de tener niveles normales de insulina basal en plasma, también mostraban cierta intolerancia al monosacárido [102]. En este sentido existe otro estudio que demuestra que islotes de ratones pre-diabéticos muestran una respuesta secretora a glucosa disminuida y acompañada de una reducción en la expresión de la Cx36 [108], lo que volvería a demostrar el importante papel que juega esta proteína en el mecanismo de secreción de insulina.

Por otra parte, la demostrada reversibilidad de la pérdida de ATP por depolarización tanto en islotes de ratón como de rata, nos sirvió para comprobar que un aumento de la concentración intracelular de ATP incrementaba significativamente la segunda fase de secreción de insulina estimulada por KCl 70 mM en condiciones de glucosa basal. Esta secreción además estaba parcial o totalmente inhibida en los islotes de ratón Cx36^{+/-} y Cx36^{-/-}, respectivamente y la MFQ reproducía de nuevo parcialmente este efecto, sugiriendo que el grado de expresión o el bloqueo de la Cx36, no sólo sería importante para el intercambio y difusión de moléculas sino que también estaría implicado en la secreción de insulina [83, 87]. Sin embargo, ya que se ha descrito que uno de los factores determinantes para que tenga lugar una secreción de insulina es el cociente ATP/ADP [42], las diferencias encontradas en la respuesta secretora de ambos genotipos también podrían explicarse por los valores de este cociente obtenido para cada uno, ya que en el caso de los islotes Cx36^{-/-} no superaban los valores estimulantes ni en condiciones basales ni en presencia de KCl con ATP extracelular; además de los defectos en el mecanismo de acoplamiento estímulo-secreción que provocaría el bloqueo de la comunicación intercelular [97]. No obstante, la delección del gen para la Cx36 o su inhibición por MFQ no sólo afectaría a la comunicación intercelular ("*gap junctions*") sino también a la entrada de ATP por los "hemicanales". Por eso, la inhibición parcial de la secreción por parte de un análogo no metabolizable de glucosa (3-o-metil-D-glucosa), que sólo antagonizaría con los "hemicanales", se debería a que estaría impidiendo la entrada de ATP necesaria para la estimulación de la respuesta.

En resumen, se podría concluir que, además de una comunicación intercelular a través de las "*gap junctions*" implicada en la sincronización de las respuestas celulares individuales con la estimulación por glucosa, ésta podría contribuir directamente al mantenimiento de niveles intracelulares de ATP estimuladores por cierre de "hemicanales" o indirectamente a través de su metabolismo.

2. MECANISMO DE ACOPLAMIENTO ENTRE ATP Y LA SECRECIÓN DE INSULINA

Es una idea ampliamente aceptada que el mecanismo de secreción de insulina en las células β tiene lugar mediante una depolarización de la membrana por el cierre de los canales K_{ATP} dando lugar a una apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, aumentando así la $[Ca^{2+}]_i$ y provocando la exocitosis de los gránulos [36]. Sin embargo, se ha demostrado que una concentración estimulante de glucosa provoca una respuesta bifásica de la hormona, mientras que una simple depolarización con KCl o el cierre de los canales K_{ATP} por agentes bloqueantes lo hace de manera monofásica [34]. El mecanismo responsable por el cuál aparece una segunda fase de secreción en la estimulación por determinados secretagogos ha sido un campo muy estudiado a lo largo de los años y se ha postulado que sería debida al incremento de algún metabolito o cofactor, aunque hoy día es un tema todavía por esclarecer. A pesar de la existencia de compuestos capaces de aumentar la secreción de insulina actuando sobre los canales K_{ATP} , el diseño de nuevos fármacos que pudieran restaurar la segunda fase de secreción sería un avance en la terapia de pacientes diabéticos [36]. Por lo tanto, el estudio de estos mecanismos podría ser una herramienta para el desarrollo farmacológico frente a esta patología.

Existen diversos estudios que han otorgado al propio ATP, generado en el metabolismo de la glucosa, un papel esencial en la respuesta bifásica de insulina [132]. Tal y como hemos comprobado en nuestros ensayos, la exposición de islotes a ATP 1 mM en presencia de KCl 70 mM incrementó el contenido del nucleótido a niveles fisiológicos (G5), no observándose un aumento de la segunda fase de secreción. En cambio, con ATP 5 mM, en los que los niveles de ATP eran próximos a los alcanzados con G20, sí que se originó un incremento en esta segunda fase. La presencia de ATP 10 mM aumentó además tanto la primera como la segunda fase, lo que parece indicar que, además de ser un factor importante en la fase de amplificación de la respuesta [36, 40], también podría estar implicado en la fase de iniciación, independientemente de los canales K_{ATP} . Además, antagonistas de receptores purinérgicos P_2 (*suramina*) o A_1 (*CGS 14943*) no modificaron la respuesta en condiciones no depolarizantes, descartando así probablemente que el incremento de la respuesta sea debida a la modulación de estos receptores de membrana.

Se ha descrito que la concentración total de ATP en islotes incubados con glucosa es alrededor de un orden de magnitud (rango milimolar) por encima de la constante de inhibición (K_i) de los canales K_{ATP} ($\sim 10 \mu M$) y del rango micromolar en parches de membrana aislados [133]. Por otra parte, se ha demostrado que estos canales son activados por ADP e inac-

tivados por ATP, por lo que se propuso que su actividad estaría regulada por cambios en el cociente ATP/ADP y no sólo exclusivamente por la concentración de ATP [134]. Así, hemos comprobado que la disminución de este cociente por exposición de los islotes a ATP y ADP (5 mM) simultáneamente inhibía parcialmente la segunda fase de secreción de insulina estimulada por ATP en condiciones depolarizantes, lo que confirmaba la importancia de este cociente en la fase de amplificación de la respuesta secretora, coincidiendo también con su implicación en el mecanismo de exocitosis de los gránulos de insulina correspondientes a esta segunda fase [14].

Además del ATP, han sido propuestos otros moduladores de esta fase de amplificación como el cAMP o el NADPH. En nuestros ensayos hemos observado que el cAMP incrementó significativamente la secreción estimulada por ATP extracelular en presencia de KCl (resultados no mostrados), lo que, además de confirmar resultados ya publicados [48], apoyaría el carácter fisiológico de esta estimulación. Sin embargo, en el caso del NADPH no observamos aumento de la secreción, debido posiblemente a la baja concentración utilizada en el ensayo (1 mM) para islotes, aunque se ha descrito en estudios de “*patch-clamp*” que 50 μ M incrementaba la capacitancia de la membrana originando un aumento en la exocitosis de los gránulos [135]. Estudios más recientes han sugerido un papel importante en la secreción de insulina de la producción de este NADPH en el metabolismo cíclico del piruvato mediante tres sistemas “*lanzaderas*”: los ciclos piruvato/malato, piruvato/citrato y piruvato/isocitrato [136]. Los dos primeros se basan en la regeneración de piruvato a partir de malato mediante la enzima málica dependiente de NADP⁺. Se ha descrito que la supresión génica o metabólica de alguno de los enzimas componentes de estos sistemas no alteraban la respuesta secretora a glucosa, lo que descartaría su participación en el mecanismo de secreción [137, 138]. Sin embargo, la supresión del transportador mitocondrial citrato/isocitrato (CIC) o de la isocitrato deshidrogenasa (enzima que produce α -cetoglutarato y NADPH a partir de isocitrato) sí que resultaba en un bloqueo de esta secreción [139, 140]. Por ello, tanto el α -cetoglutarato (α -KG) como el NADPH se han considerado como posibles mediadores en la estimulación de la exocitosis, aunque su mecanismo es desconocido [136]. Además, el flujo continuo del α -KG a través de su transportador mitocondrial para alimentar el ciclo piruvato/isocitrato también estaría implicado en la respuesta secretora, ya que la supresión de este transportador provocó una disminución en la secreción [141].

A pesar del papel propuesto para otro tipo de reguladores, como se ha comentado anteriormente, multitud de autores han asignado al ATP un papel esencial en el mecanismo de

secreción. Sin embargo, la importancia relativa de su producción citosólica o mitocondrial y su implicación en este mecanismo ha sido poco estudiada. Por ello, nos propusimos profundizar en el estudio del acoplamiento entre la generación de ATP por diversos metabolitos (glucolíticos o mitocondriales) (**figura 48**) y la estimulación de la secreción con ayuda del modelo experimental de islotes “*permeabilizados*” por KCl. La validez de este modelo fue apoyada por el incremento de la secreción estimulada por fosfoenolpiruvato (PEP) en condiciones depolarizantes (G5 + 70KCl), al contrario que en condiciones basales (G5), donde no se modificaba la respuesta.

Existen evidencias en contra y a favor de la importancia del ATP glucolítico o mitocondrial en la secreción de insulina estimulada por glucosa. Por una parte, existen estudios que demuestran que la estimulación con nutrientes secretagogos que se metabolizan principalmente en la mitocondria como son el KIC o el derivado metiléster del succinato, provoca un incremento de la respuesta secretora y el bloqueo de la respiración mitocondrial lo inhibía [142, 143]. Estos datos sugerían la importancia primordial del ATP generado a nivel mitocondrial. Sin embargo, en contra de esta hipótesis, se demostró que un metabolito glucolítico como era el gliceraldehído-3-fosfato (GAP) inducía una respuesta, mientras que el piruvato, que genera el ATP en la mitocondria, no estimulaba la secreción [144]. Incluso la inhibición del transportador mitocondrial de piruvato o del ciclo de Krebs no afectaba a esta respuesta [145], sugiriendo que es el ATP citosólico el que estaría más ligado al mecanismo de secreción.

Tal y como se muestra en nuestros ensayos, metabolitos que participan en las etapas iniciales e intermedias de la glucolisis como son la G6P o el GAP, respectivamente, estimularon una segunda fase de secreción, no afectada por una inhibición de la piruvato quinasa (PK) (etapa glucolítica previa a la entrada al ciclo de Krebs) o del complejo I mitocondrial con fenilalanina o rotenona, respectivamente. Estos resultados indicarían que la generación de ATP en las reacciones de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) + 1,3-disfosfoglicerato quinasa podría ser suficiente para inducir una respuesta insulínica. Esta conclusión se ve reforzada con la disminución observada en la secreción estimulada por GAP por parte del iodoacetato (inhibidor de la GAPDH). Además, algunos estudios han indicado que la re-oxidación del NADH derivado del GAP en la cadena respiratoria mitocondrial mediante los sistemas lanzadera “*glicerol-fosfato*” y “*malato-aspartato*” podría ser importante en la secreción, ya que islotes de ratones que tenían noqueado el gen de la glicerol-fosfato deshidrogenasa e incubados con aminoociacetato (inhibidor de la lanzadera “*malato-aspartato*”) no

respondían a glucosa [146, 147]. Como se observa en nuestros ensayos, la inhibición del complejo III de la cadena respiratoria (posterior al complejo II donde se re-oxida el NADH) con antimicina A, bloqueó parcialmente la secreción estimulada por G6P, al mismo tiempo que inhibía significativamente tanto el contenido como la acumulación extracelular de ATP. Por lo tanto, una producción directa (reacción glucolítica) o indirecta (a través de la re-oxidación del NADH) de ATP en el citosol otorgaría un papel clave a esta señal en el mecanismo de secreción de insulina.

De hecho, se ha demostrado que algunas de estas enzimas glucolíticas, cuya expresión en células β es significativamente más elevada que la de las enzimas mitocondriales, estarían implicadas en la regulación de la actividad de los canales de K_{ATP} , parte esencial en el mecanismo de secreción [43, 148]. En el caso de la estimulación de la secreción por GAP, se postuló que el complejo enzimático que da lugar a la producción de ATP (GAPDH/1,3-disfosfoglicerato quinasa) estaría asociado a las vesículas de insulina y por lo tanto implicado en el proceso de cebado de los gránulos mediante acidificación por la ATPasa de protones tipo V ($V\text{-ATPasa } H^+$) [57, 149]. Apoyando esta hipótesis se demostró que la inhibición a nivel de la glucólisis con arsenato o fluoruro (inhibidores de la 1,3-disfosfoglicerato quinasa o la enolasa, respectivamente) reducía significativamente la respuesta a glucosa, mientras que la inhibición a nivel del ciclo de Krebs con monofluoroacetato o del transportador mitocondrial de piruvato con α -ciano-4-hidroxicianamato, no tenían efecto [150].

También se ha descrito que el acoplamiento entre el ciclo de Krebs y la anaplerosis (generación de intermediarios del TCA y exportación al citosol) es esencial para que tenga lugar la secreción de insulina [151]. Recientemente se ha propuesto otro mecanismo en el que el PEP, convertido a piruvato por la PK, entra en el ciclo de Krebs como oxalacetato, pudiendo ser regenerado de nuevo por la PEP-carboxiquinasa mitocondrial (PEPCK-M) y transportado al citosol por un transportador aniónico (ciclo del PEP) [152]. Esto explicaría los resultados que obtuvimos en nuestros experimentos, en los que el PEP estimuló una segunda fase de secreción, debido probablemente a la generación citosólica mantenida de ATP por la PK y la posible participación del nucleótido en el cebado de los gránulos. La inhibición de la PK por fenilalanina provocó una disminución en la respuesta secretora, mientras que el bloqueo de la cadena respiratoria con rotenona no tuvo efecto, coincidiendo con los datos obtenidos en la acumulación extracelular de ATP. La mayor probabilidad de un intercambio de ATP generado en el citosol con el medio extracelular en estas condiciones depolarizantes, apoyaría la hipótesis de la importancia de la generación de ATP citosólico en la secreción insulínica. La

demostración de una mayor actividad de esta enzima en comparación con otras enzimas glucolíticas [153], reforzaría además su capacidad para una producción mantenida y suficiente de ATP en el citosol para el proceso secretor. Finalmente, la existencia de “microdominios” de ATP debajo de la membrana plasmática observados en células β aisladas en presencia de glucosa [154], explicaría la generación de ATP en el entorno de la membrana y su importancia en la respuesta secretora, incluso para la activación de la exocitosis de los gránulos de insulina.

Por otra parte, se ha visto que un sustrato productor de ATP mitocondrial como es el piruvato, a pesar de su alto grado de oxidación, no induce una respuesta secretora [17, 150]. Algunos autores argumentan que parte del piruvato se convertiría en lactato por la lactato deshidrogenasa (LDH), consumiendo simultáneamente equivalentes de NADH, aunque esto ha sido rebatido por otro trabajo en el que indican la baja actividad (en células productoras de insulina) de esta enzima y del transportador mitocondrial de monocarboxilatos (MCT) [18]. Sin embargo, se podía pensar también que la incapacidad de estimular la secreción podría deberse a la impermeabilidad de la membrana plasmática a este metabolito en condiciones no depolarizantes. No obstante, nosotros observamos un ligero incremento en la segunda fase de secreción en presencia de KCl, pero de menor magnitud que la observada con los sustratos glucolíticos. Aunque a día de hoy no se ha dado una explicación clara de por qué el piruvato no estimula la secreción, la menor producción de ATP en el citosol observada en nuestros resultados en comparación a otros metabolitos podría explicar parcialmente este hecho.

Se ha comprobado que ésteres derivados de determinados intermediarios del ciclo de Krebs, siendo permeables a la membrana, no estimulan la secreción [155]. Sin embargo, sorprendentemente, derivados esterificados del succinato sí que se han descrito como potentes secretagogos [44, 156], coincidiendo con nuestros resultados en los que el propio succinato aumentaba la secreción de insulina en condiciones depolarizantes. La inhibición de la succínico deshidrogenasa con malonato provocó una disminución de esta respuesta, como ya ha sido mostrado en un trabajo realizado en nuestro laboratorio [156]. Probablemente la regeneración de PEP mediante la PEPCK-M en el ciclo del PEP [152], pudiendo producir ATP en el citosol por la PK, podría explicar en parte la capacidad insulínica de este metabolito mitocondrial frente a otros metabolitos.

En conclusión, la síntesis de ATP en el citosol, producida directamente en la glucólisis o indirectamente por señales mitocondriales, podría estar más ligada al mecanismo de estimulación de la secreción de insulina por glucosa, tanto en la iniciación (1ª fase) como en la amplificación de la respuesta (2ª fase), que el ATP generado a nivel mitocondrial (**figura 48**). Por lo que pequeñas alteraciones en estas etapas del metabolismo podrían traducirse en defectos en la sensibilidad de las células β a glucosa, característica asociada al desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2. Así, el posible aporte de algún sustrato que pudiera generar el ATP localmente en alguna reacción glucolítica, podría aliviar un posible defecto en el metabolismo de la glucosa, lo cual ayudaría al desarrollo de nuevas terapias antidiabéticas.

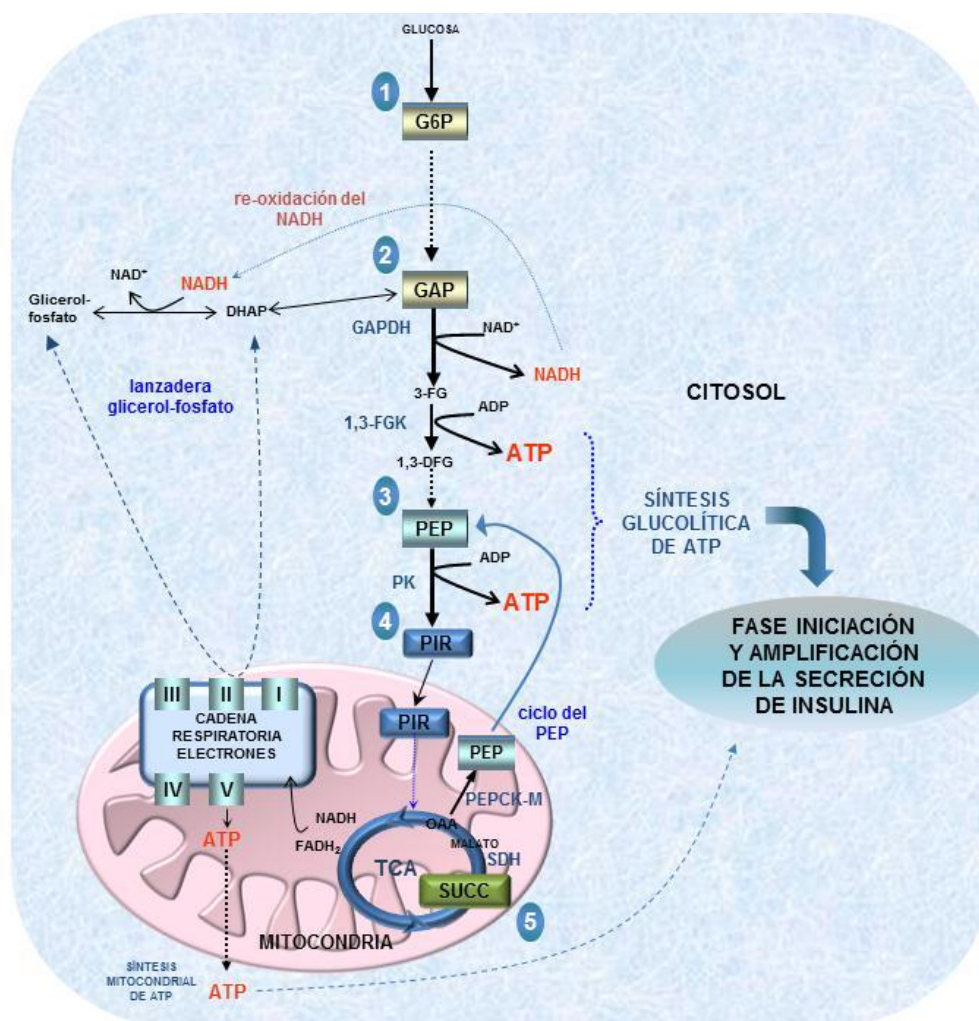


Figura 48. Representación esquemática de la síntesis de ATP en el citosol y en la mitocondria. Los números indican los 5 metabolitos estudiados en este trabajo: (1) G6P (glucosa-6-fosfato) y (2) GAP (gliceraldehído-3-fosfato): síntesis de ATP en el citosol y re-oxidación del NADH mediante la lanzadera glicerol-fosfato. (3) PEP (fosfoenolpiruvato): síntesis de ATP en el citosol y regeneración del PEP por la PEPCK-M (ciclo del PEP, [152]). (4) PIR (piruvato): síntesis de ATP en la mitocondria (5) SUCC (succínico): síntesis de ATP en la mitocondria o la producción de PEP a partir de OAA por la PEPCK-M y su salida al citosol para generar de nuevo ATP en el citosol por la PK (ciclo del PEP, [152]). GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), 1,3-FGK (1,3-fosfoglicerato quinasa), PK (piruvato quinasa), SDH (succínico deshidrogenasa), TCA (ciclo de los ácidos tricarboxílicos), PEPCK-M (fosfoenolpiruvato carboxiquinasa mitocondrial), OAA (oxalacetato).

CONCLUSIONES

- Las células β pancreáticas poseen “hemicanales” funcionales constituidos por Cx36 por los que pierden aminoácidos y nucleótidos de adenina al ser depolarizadas con concentraciones de KCl superiores a las fisiológicas. El flujo de ATP es reversible aumentando su concentración extracelular y puede ser bloqueado totalmente en islotes de ratones transgénicos con delección global del gen de la Cx36 y parcialmente por MFQ, un inhibidor de Cx36.
- La apertura de los “hemicanales” por depolarización es bloqueada específicamente por una concentración de glucosa estimuladora de la secreción de insulina, pudiendo tener valor fisiológico, ya que, otros nutrientes secretagogos (KIC o SSA), con capacidades similares a la glucosa para elevar el contenido insular de ATP y estimular una secreción bifásica de insulina, no previenen completamente este efecto.
- El efecto preventivo de la glucosa es remedado parcialmente por análogos estructurales del azúcar no metabolizables que mantienen el contenido insular de ATP en valores basales (G5). Estos análogos se comportarían como antagonistas de “hemicanales” de Cx36 y, como la propia glucosa, no ejercerían ningún efecto sobre la permeabilidad de los canales intercelulares en las “*gap junctions*”.
- Según la bibliografía, valores de depolarización de las células β alcanzados con una concentración máxima de glucosa (G20) se acercan a la depolarización obtenida con KCl 30mM. Por lo tanto, se podría considerar plausible que el cierre de “hemicanales” por la glucosa prevendría los efectos deletéreos de la depolarización celular acompañante y potenciaría la elevación de la concentración citosólica de ATP o del cociente ATP/ADP generada por su propio metabolismo.
- La inhibición química o la delección genética de la Cx36 bloquea la estimulación de la secreción de insulina en islotes pancreáticos provocado por el cierre de los canales intercelulares en las regiones “*gap junctions*” de la membrana plasmática. La supresión global de los dos alelos del gen de la Cx36 (Cx36^{-/-}) da lugar a una secreción basal de insulina disminuida y una supresión casi completa de la respuesta en estos islotes. Estos cambios *in vitro* se corresponden con una intolerancia a la glucosa *in vivo* descrita en una reciente publicación y apoyada por nuestros propios datos.

- La MFQ reduce la respuesta bifásica de insulina a glucosa y otros nutrientes secretagogos, debido seguramente a la inhibición de la Cx36 en los canales de las “*gap junctions*” que bloquearía la comunicación intercelular. Este efecto predominaría sobre el posible efecto potenciador del cierre de los “hemicanales”. De hecho, islotes Cx36^{-/-} muestran niveles de ATP en condiciones basales muy superiores a los de islotes controles, permaneciendo el cociente ATP/ADP en valores basales no estimulantes.
- Los islotes “*permeabilizados*” por depolarización constituyen un modelo válido que permite la manipulación de la concentración intracelular de diferentes metabolitos (menores de 1 kDa) y el estudio de su efecto secretor.
- El ATP extracelular estimula la secreción de insulina de forma dependiente de su concentración. Los aumentos del contenido intracelular de ATP y de la secreción de insulina son parcialmente suprimidos por MFQ o por análogos no metabolizables de la glucosa que actuarían cerrando “hemicanales”. El efecto es reversible pues la estimulación de la secreción cesa al retirar el estímulo y al volver a condiciones control no depolarizantes.
- Intermediarios glucolíticos (G6P, GAP, PEP) que participan en reacciones acopladas a fosforilaciones ligadas al sustrato estimulan la secreción de insulina cuando se acompañan de los correspondientes cofactores. Su bloqueo por inhibidores de las enzimas glucolíticas, pero no por inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial, parece destacar la importancia de la generación de ATP citosólico sobre el mitocondrial en la respuesta secretora.

BIBLIOGRAFÍA

1. King, H., R.E. Aubert and W.H. Herman, *Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections*. *Diabetes Care*, 1998. **21**(9): p. 1414-31.
2. A.D.A., *Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*. *Diabetes Care*, 1997. **20**(7): p. 1183-97.
3. Bastaki, S., *Diabetes mellitus and its treatment*. *Int J Diabetes & Metabolism* 2005. **13**: p. 111-134.
4. Yoon, J.W., C.S. Yoon, H.W. Lim, Q.Q. Huang, Y. Kang, K.H. Pyun, K. Hirasawa, R.S. Sherwin and H.S. Jun, *Control of autoimmune diabetes in NOD mice by GAD expression or suppression in beta cells*. *Science*, 1999. **284**(5417): p. 1183-7.
5. Gillespie, K.M., *Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention*. *CMAJ*, 2006. **175**(2): p. 165-70.
6. Pozzilli, P. and R.D. Leslie, *Hyperexpression of GAD in the islets may be relevant but is it sufficient to induce autoimmune insulinitis?* *Diabetologia*, 1997. **40**(3): p. 357-61.
7. Von Boehmer, H. and A. Sarukhan, *GAD, a single autoantigen for diabetes*. *Science*, 1999. **284**(5417): p. 1135, 1137.
8. Atkinson, M.A. and N.K. Maclaren, *The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus*. *N Engl J Med*, 1994. **331**(21): p. 1428-36.
9. Chang-Chen, K.J., R. Mullur and E. Bernal-Mizrachi, *Beta-cell failure as a complication of diabetes*. *Rev Endocr Metab Disord*, 2008. **9**(4): p. 329-43.
10. Prentki, M. and C.J. Nolan, *Islet beta cell failure in type 2 diabetes*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(7): p. 1802-12.
11. A.D.A., *Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*. *Diabetes Care*, 2004. **27**(Suppl.1): p. S5-S10.
12. Quesada, I., E. Tudurí and A. Nadal, *Regulación por glucosa de la función de las células alfa, beta y delta en el islote de Langerhans*. . *El islote pancreático en el desarrollo y tratamiento de la diabetes*. Editorial de la Sociedad Española de Diabetes, 2007. **Capítulo 1**.

13. Cabrera, O., D.M. Berman, N.S. Kenyon, C. Ricordi, P.O. Berggren and A. Caicedo, *The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(7): p. 2334-9.
14. MacDonald, P.E., J.W. Joseph and P. Rorsman, *Glucose-sensing mechanisms in pancreatic beta-cells*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2005. **360**(1464): p. 2211-25.
15. Newgard, C.B. and J.D. McGarry, *Metabolic coupling factors in pancreatic beta-cell signal transduction*. Annu Rev Biochem, 1995. **64**: p. 689-719.
16. Matschinsky, F.M., *Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm*. Diabetes, 1996. **45**(2): p. 223-41.
17. Sener, A., S. Kawazu, J.C. Hutton, A.C. Boschero, G. Devis, G. Somers, A. Herchuelz and W.J. Malaisse, *The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Effect of exogenous pyruvate on islet function*. Biochem J, 1978. **176**(1): p. 217-32.
18. Ishihara, H., H. Wang, L.R. Drewes and C.B. Wollheim, *Overexpression of monocarboxylate transporter and lactate dehydrogenase alters insulin secretory responses to pyruvate and lactate in beta cells*. J Clin Invest, 1999. **104**(11): p. 1621-9.
19. Sekine, N., V. Cirulli, R. Regazzi, L.J. Brown, E. Gine, J. Tamarit-Rodriguez, M. Girotti, S. Marie, M.J. MacDonald, C.B. Wollheim and et al., *Low lactate dehydrogenase and high mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase in pancreatic beta-cells. Potential role in nutrient sensing*. J Biol Chem, 1994. **269**(7): p. 4895-902.
20. Zhao, C., M.C. Wilson, F. Schuit, A.P. Halestrap and G.A. Rutter, *Expression and distribution of lactate/monocarboxylate transporter isoforms in pancreatic islets and the exocrine pancreas*. Diabetes, 2001. **50**(2): p. 361-6.
21. Ashcroft, F.M. and P. Rorsman, *Electrophysiology of the pancreatic beta-cell*. . Press Inc, 1995: p. 207-242.
22. MacDonald, M.J., *Elusive proximal signals of beta-cells for insulin secretion*. Diabetes, 1990. **39**(12): p. 1461-6.
23. Moreno-Sánchez, R., *Regulation of oxidative phosphorylation in mitochondria by external free Ca²⁺ concentrations*. J Biol Chem, 1985. **260**(7): p. 4028-34.

24. Malaisse, W.J., A. Sener, F. Malaisse-Legae, J.C. Hutton and J. Christophe, *The stimulus-secretion coupling of amino acid-induced insulin release. Metabolic interaction of L-glutamine and 2-ketoisocaproate in pancreatic islets*. *Biochim Biophys Acta*, 1981. **677**(1): p. 39-49.
25. Gao, Z., R.A. Young, G. Li, H. Najafi, C. Buettger, S.S. Sukumvanich, R.K. Wong, B.A. Wolf and F.M. Matschinsky, *Distinguishing features of leucine and alpha-ketoisocaproate sensing in pancreatic beta-cells*. *Endocrinology*, 2003. **144**(5): p. 1949-57.
26. Fernández-Pascual, S., A. Mukala-Nsengu-Tshibangu, R. Martín Del Río and J. Tamarit-Rodríguez, *Conversion into GABA (gamma-aminobutyric acid) may reduce the capacity of L-glutamine as an insulin secretagogue*. *Biochem J*, 2004. **379**(Pt 3): p. 721-9.
27. Li, C., H. Najafi, Y. Daikhin, I.B. Nissim, H.W. Collins, M. Yudkoff, F.M. Matschinsky and C.A. Stanley, *Regulation of leucine-stimulated insulin secretion and glutamine metabolism in isolated rat islets*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(5): p. 2853-8.
28. Maechler, P. and C.B. Wollheim, *Mitochondrial glutamate acts as a messenger in glucose-induced insulin exocytosis*. *Nature*, 1999. **402**(6762): p. 685-9.
29. Maechler, P., A. Gjinovci and C.B. Wollheim, *Implication of glutamate in the kinetics of insulin secretion in rat and mouse perfused pancreas*. *Diabetes*, 2002. **51 Suppl 1**: p. S99-102.
30. Pizarro-Delgado, J., I. Hernández-Fisac, R. Martín-Del-Río and J. Tamarit-Rodríguez, *Branched-chain 2-oxoacid transamination increases GABA-shunt metabolism and insulin secretion in isolated islets*. *Biochem J*, 2009. **419**(2): p. 359-68.
31. Ashcroft, F.M. and F.M. Gribble, *ATP-sensitive K⁺ channels and insulin secretion: their role in health and disease*. *Diabetologia*, 1999. **42**(8): p. 903-19.
32. Ashcroft, S.J., L.C. Weerasinghe and P.J. Randle, *Interrelationship of islet metabolism, adenosine triphosphate content and insulin release*. *Biochem J*, 1973. **132**(2): p. 223-31.
33. Chandra, J., S.N. Yang, M. Kohler, S. Zaitsev, L. Juntti-Berggren, P.O. Berggren, B. Zhivotovsky and S. Orrenius, *Effects of serum from patients with type 1 diabetes on primary cerebellar granule cells*. *Diabetes*, 2001. **50 Suppl 1**: p. S77-81.
34. Hatlapatka, K., M. Willenborg and I. Rustenbeck, *Plasma membrane depolarization as a determinant of the first phase of insulin secretion*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009. **297**(2): p. E315-22.

35. Gerich, J.E., *Is reduced first-phase insulin release the earliest detectable abnormality in individuals destined to develop type 2 diabetes?* Diabetes, 2002. **51 Suppl 1**: p. S117-21.
36. Henquin, J.C., *Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose.* Diabetes, 2000. **49(11)**: p. 1751-60.
37. Gembal, M., P. Gilon and J.C. Henquin, *Evidence that glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive K⁺ channels in mouse B cells.* J Clin Invest, 1992. **89(4)**: p. 1288-95.
38. Sato, Y., T. Aizawa, M. Komatsu, N. Okada and T. Yamada, *Dual functional role of membrane depolarization/Ca²⁺ influx in rat pancreatic B-cell.* Diabetes, 1992. **41(4)**: p. 438-43.
39. Nenquin, M., A. Szollosi, L. Aguilar-Bryan, J. Bryan and J.C. Henquin, *Both triggering and amplifying pathways contribute to fuel-induced insulin secretion in the absence of sulfonylurea receptor-1 in pancreatic beta-cells.* J Biol Chem, 2004. **279(31)**: p. 32316-24.
40. Henquin, J.C., *Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation.* Diabetologia, 2009. **52(5)**: p. 739-51.
41. Ishiyama, N., M.A. Ravier and J.C. Henquin, *Dual mechanism of the potentiation by glucose of insulin secretion induced by arginine and tolbutamide in mouse islets.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006. **290(3)**: p. E540-9.
42. Detimary, P., P. Gilon and J.C. Henquin, *Interplay between cytoplasmic Ca²⁺ and the ATP/ADP ratio: a feedback control mechanism in mouse pancreatic islets.* Biochem J, 1998. **333 (Pt 2)**: p. 269-74.
43. Dhar-Chowdhury, P., M.D. Harrell, S.Y. Han, D. Jankowska, L. Parachuru, A. Morrissey, S. Srivastava, W. Liu, B. Malester, H. Yoshida and W.A. Coetzee, *The glycolytic enzymes, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, triose-phosphate isomerase, and pyruvate kinase are components of the K_{ATP} channel macromolecular complex and regulate its function.* J Biol Chem, 2005. **280(46)**: p. 38464-70.
44. MacDonald, M.J., L.A. Fahien, L.J. Brown, N.M. Hasan, J.D. Buss and M.A. Kendrick, *Perspective: emerging evidence for signaling roles of mitochondrial anaplerotic products in insulin secretion.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005. **288(1)**: p. E1-15.

45. MacDonald, M.J. and L.A. Fahien, *Glutamate is not a messenger in insulin secretion*. J Biol Chem, 2000. **275**(44): p. 34025-7.
46. Corkey, B.E., M.C. Glennon, K.S. Chen, J.T. Deeney, F.M. Matschinsky and M. Prentki, *A role for malonyl-CoA in glucose-stimulated insulin secretion from clonal pancreatic beta-cells*. J Biol Chem, 1989. **264**(36): p. 21608-12.
47. Ammon, H.P. and J. Steinke, *6-Amnionicotinamide (6-AN) as a diabetogenic agent. In vitro and in vivo studies in the rat*. Diabetes, 1972. **21**(3): p. 143-8.
48. Dyachok, O., O. Idevall-Hagren, J. Sagetorp, G. Tian, A. Wuttke, C. Arrieumerlou, G. Akusjarvi, E. Gylfe and A. Tengholm, *Glucose-induced cyclic AMP oscillations regulate pulsatile insulin secretion*. Cell Metab, 2008. **8**(1): p. 26-37.
49. Rorsman, P. and E. Renstrom, *Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells*. Diabetologia, 2003. **46**(8): p. 1029-45.
50. Ohara-Imaizumi, M., Y. Nakamichi, T. Tanaka, H. Ishida and S. Nagamatsu, *Imaging exocytosis of single insulin secretory granules with evanescent wave microscopy: distinct behavior of granule motion in biphasic insulin release*. J Biol Chem, 2002. **277**(6): p. 3805-8.
51. Rorsman, P., *The pancreatic beta-cell as a fuel sensor: an electrophysiologist's viewpoint*. Diabetologia, 1997. **40**(5): p. 487-95.
52. Ivarsson, R., S. Obermuller, G.A. Rutter, J. Galvanovskis and E. Renstrom, *Temperature-sensitive random insulin granule diffusion is a prerequisite for recruiting granules for release*. Traffic, 2004. **5**(10): p. 750-62.
53. Hume, A.N., L.M. Collinson, C.R. Hopkins, M. Strom, D.C. Barral, G. Bossi, G.M. Griffiths and M.C. Seabra, *The leaden gene product is required with Rab27a to recruit myosin Va to melanosomes in melanocytes*. Traffic, 2002. **3**(3): p. 193-202.
54. Meldolesi, J. and E. Chiergatti, *Fusion has found its calcium sensor*. Nat Cell Biol, 2004. **6**(6): p. 476-8.
55. Barg, S., L. Eliasson, E. Renstrom and P. Rorsman, *A subset of 50 secretory granules in close contact with L-type Ca²⁺ channels accounts for first-phase insulin secretion in mouse beta-cells*. Diabetes, 2002. **51 Suppl 1**: p. S74-82.

56. Olsen, H.L., M. Hoy, W. Zhang, A.M. Bertorello, K. Bokvist, K. Capito, A.M. Efanov, B. Meister, P. Thams, S.N. Yang, P. Rorsman, P.O. Berggren and J. Gromada, *Phosphatidylinositol 4-kinase serves as a metabolic sensor and regulates priming of secretory granules in pancreatic beta cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(9): p. 5187-92.
57. Barg, S., P. Huang, L. Eliasson, D.J. Nelson, S. Obermuller, P. Rorsman, F. Thevenod and E. Renstrom, *Priming of insulin granules for exocytosis by granular Cl(-) uptake and acidification*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 11): p. 2145-54.
58. Taraska, J.W., D. Perrais, M. Ohara-Imaizumi, S. Nagamatsu and W. Almers, *Secretory granules are recaptured largely intact after stimulated exocytosis in cultured endocrine cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(4): p. 2070-5.
59. Donoghue, P.C. and J.B. Antcliffe, *Early life: Origins of multicellularity*. Nature, 2010. **466**(7302): p. 41-2.
60. LeRoith, D., C. Roberts, Jr., M.A. Lesniak and J. Roth, *Receptors for intercellular messenger molecules in microbes: similarities to vertebrate receptors and possible implications for diseases in man*. Experientia, 1986. **42**(7): p. 782-8.
61. Roth, J., D. LeRoith, J. Shiloach, J.L. Rosenzweig, M.A. Lesniak and J. Havrankova, *The evolutionary origins of hormones, neurotransmitters, and other extracellular chemical messengers: implications for mammalian biology*. N Engl J Med, 1982. **306**(9): p. 523-7.
62. Harris, A.L., *Emerging issues of connexin channels: biophysics fills the gap*. Q Rev Biophys, 2001. **34**(3): p. 325-472.
63. Phelan, P. and T.A. Starich, *Innexins get into the gap*. Bioessays, 2001. **23**(5): p. 388-96.
64. Boassa, D., C. Ambrosi, F. Qiu, G. Dahl, G. Gaietta and G. Sosinsky, *Pannexin1 channels contain a glycosylation site that targets the hexamer to the plasma membrane*. J Biol Chem, 2007. **282**(43): p. 31733-43.
65. Bauer, R., C. Lehmann, B. Fuss, F. Eckardt and M. Hoch, *The Drosophila gap junction channel gene innexin 2 controls foregut development in response to Wingless signalling*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 9): p. 1859-67.
66. Boassa, D., F. Qiu, G. Dahl and G. Sosinsky, *Trafficking dynamics of glycosylated pannexin 1 proteins*. Cell Commun Adhes, 2008. **15**(1): p. 119-32.

67. Goodenough, D.A. and D.L. Paul, *Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(4): p. 285-94.
68. Dobrowolski, R. and K. Willecke, *Connexin-caused genetic diseases and corresponding mouse models*. Antioxid Redox Signal, 2009. **11**(2): p. 283-95.
69. Meda, P. and D. Spray, *Gap junctions function*. Adv Mol Cell Biol, 2000. **30**: p. 263-322.
70. Herve, J.C., *The connexins*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1662**(1-2): p. 1-2.
71. Bosco, D., J.A. Haefliger and P. Meda, *Connexins: key mediators of endocrine function*. Physiol Rev, 2011. **91**(4): p. 1393-445.
72. Bennett, M.V., X. Zheng and M.L. Sogin, *The connexins and their family tree*. Soc Gen Physiol Ser, 1994. **49**: p. 223-33.
73. Saez, J.C., A.D. Martinez, M.C. Branes and H.E. Gonzalez, *Regulation of gap junctions by protein phosphorylation*. Braz J Med Biol Res, 1998. **31**(5): p. 593-600.
74. Musil, L.S. and D.A. Goodenough, *Biochemical analysis of connexin-43 intracellular transport, phosphorylation, and assembly into gap junctional plaques*. J Cell Biol, 1991. **115**(5): p. 1357-74.
75. Koval, M., *Pathways and control of connexin oligomerization*. Trends Cell Biol, 2006. **16**(3): p. 159-66.
76. Laird, D.W., *Life cycle of connexins in health and disease*. Biochem J, 2006. **394**(Pt 3): p. 527-43.
77. Scemes, E., D.C. Spray and P. Meda, *Connexins, pannexins, innexins: novel roles of "hemichannels"*. Pflugers Arch, 2009. **457**(6): p. 1207-26.
78. Hofer, A. and R. Dermietzel, *Visualization and functional blocking of gap junction hemichannels (connexons) with antibodies against external loop domains in astrocytes*. Glia, 1998. **24**(1): p. 141-54.
79. Spray, D.C., Z.C. Ye and B.R. Ransom, *Functional connexin "hemichannels": a critical appraisal*. Glia, 2006. **54**(7): p. 758-73.

80. Srinivas, M., J. Kronengold, F.F. Bukauskas, T.A. Bargiello and V.K. Verselis, *Correlative studies of gating in Cx46 and Cx50 hemichannels and gap junction channels*. *Biophys J*, 2005. **88**(3): p. 1725-39.
81. Steinberg, T.H., A.S. Newman, J.A. Swanson and S.C. Silverstein, *ATP⁴⁻ permeabilizes the plasma membrane of mouse macrophages to fluorescent dyes*. *J Biol Chem*, 1987. **262**(18): p. 8884-8.
82. John, S.A., R. Kondo, S.Y. Wang, J.I. Goldhaber and J.N. Weiss, *Connexin-43 hemichannels opened by metabolic inhibition*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(1): p. 236-40.
83. Schock, S.C., D. Leblanc, A.M. Hakim and C.S. Thompson, *ATP release by way of connexin 36 hemichannels mediates ischemic tolerance in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. **368**(1): p. 138-44.
84. Maeda, S. and T. Tsukihara, *Structure of the gap junction channel and its implications for its biological functions*. *Cell Mol Life Sci*, 2011. **68**(7): p. 1115-29.
85. Herve, J.C., *The connexins, Part III*. *Biochim Biophys Acta*, 2005. **1719**(1-2): p. 1-2.
86. Kanno, T., S.O. Gopel, P. Rorsman and M. Wakui, *Cellular function in multicellular system for hormone-secretion: electrophysiological aspect of studies on alpha-, beta- and delta-cells of the pancreatic islet*. *Neurosci Res*, 2002. **42**(2): p. 79-90.
87. Bavamian, S., P. Klee, A. Britan, C. Populaire, D. Caille, J. Cancela, A. Charollais and P. Meda, *Islet-cell-to-cell communication as basis for normal insulin secretion*. *Diabetes Obes Metab*, 2007. **9 Suppl 2**: p. 118-32.
88. Nlend, R.N., L. Michon, S. Bavamian, N. Boucard, D. Caille, J. Cancela, A. Charollais, E. Charpantier, P. Klee, M. Peyrou, C. Populaire, L. Zulianello and P. Meda, *Connexin-36 and pancreatic beta-cell functions*. *Arch Physiol Biochem*, 2006. **112**(2): p. 74-81.
89. Serre-Beinier, V., S. Le Gurun, N. Belluardo, A. Trovato-Salinaro, A. Charollais, J.A. Haefliger, D.F. Condorelli and P. Meda, *Cx36 preferentially connects beta-cells within pancreatic islets*. *Diabetes*, 2000. **49**(5): p. 727-34.
90. González-Nieto, D., J.M. Gómez-Hernández, B. Larrosa, C. Gutierrez, M.D. Muñoz, I. Fasciani, J. O'Brien, A. Zappala, F. Cicirata and L.C. Barrio, *Regulation of neuronal connexin-36 channels by pH*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(44): p. 17169-74.

91. Meda, P., M. Amherdt, A. Perrelet and L. Orci, *Metabolic coupling between cultured pancreatic beta-cells*. *Exp Cell Res*, 1981. **133**(2): p. 421-30.
92. Hempelmann, A., A. Heils and T. Sander, *Confirmatory evidence for an association of the connexin-36 gene with juvenile myoclonic epilepsy*. *Epilepsy Res*, 2006. **71**(2-3): p. 223-8.
93. White, T.W. and D.L. Paul, *Genetic diseases and gene knockouts reveal diverse connexin functions*. *Annu Rev Physiol*, 1999. **61**: p. 283-310.
94. Meda, P., *The role of gap junction membrane channels in secretion and hormonal action*. *J Bioenerg Biomembr*, 1996. **28**(4): p. 369-77.
95. Michon, L., R. Nlend Nlend, S. Bavamian, L. Bischoff, N. Boucard, D. Caille, J. Cancela, A. Charollais, E. Charpantier, P. Klee, M. Peyrou, C. Populaire, L. Zulianello and P. Meda, *Involvement of gap junctional communication in secretion*. *Biochim Biophys Acta*, 2005. **1719**(1-2): p. 82-101.
96. Scemes, E., S. Bavamian, A. Charollais, D.C. Spray and P. Meda, *Lack of "hemichannel" activity in insulin-producing cells*. *Cell Commun Adhes*, 2008. **15**(1): p. 143-54.
97. Ravier, M.A., M. Guldenagel, A. Charollais, A. Gjinovci, D. Caille, G. Sohl, C.B. Wollheim, K. Willecke, J.C. Henquin and P. Meda, *Loss of connexin-36 channels alters beta-cell coupling, islet synchronization of glucose-induced Ca²⁺ and insulin oscillations, and basal insulin release*. *Diabetes*, 2005. **54**(6): p. 1798-807.
98. Bosco, D., P. Meda, B. Thorens and W.J. Malaisse, *Heterogeneous secretion of individual B cells in response to D-glucose and to nonglucidic nutrient secretagogues*. *Am J Physiol*, 1995. **268**(3 Pt 1): p. C611-8.
99. Jonkers, F.C., J.C. Jonas, P. Gilon and J.C. Henquin, *Influence of cell number on the characteristics and synchrony of Ca²⁺ oscillations in clusters of mouse pancreatic islet cells*. *J Physiol*, 1999. **520 Pt 3**: p. 839-49.
100. Meda, P., D. Bosco, M. Chanson, E. Giordano, L. Vallar, C. Wollheim and L. Orci, *Rapid and reversible secretion changes during uncoupling of rat insulin-producing cells*. *J Clin Invest*, 1990. **86**(3): p. 759-68.

101. Speier, S., A. Gjinovci, A. Charollais, P. Meda and M. Rupnik, *Cx36-mediated coupling reduces beta-cell heterogeneity, confines the stimulating glucose concentration range, and affects insulin release kinetics*. *Diabetes*, 2007. **56**(4): p. 1078-86.
102. Head, W.S., M.L. Orseth, C.S. Nunemaker, L.S. Satin, D.W. Piston and R.K. Benninger, *Connexin-36 gap junctions regulate in vivo first- and second-phase insulin secretion dynamics and glucose tolerance in the conscious mouse*. *Diabetes*, 2012. **61**(7): p. 1700-7.
103. Calabrese, A., M. Zhang, V. Serre-Beinier, D. Caton, C. Mas, L.S. Satin and P. Meda, *Connexin-36 controls synchronization of Ca²⁺ oscillations and insulin secretion in MIN6 cells*. *Diabetes*, 2003. **52**(2): p. 417-24.
104. Klee, P., F. Allagnat, H. Pontes, M. Cederroth, A. Charollais, D. Caille, A. Britan, J.A. Haefliger and P. Meda, *Connexins protect mouse pancreatic beta cells against apoptosis*. *J Clin Invest*, 2011. **121**(12): p. 4870-9.
105. Sorenson, R.L. and T.C. Brelje, *Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: beta-cell growth, enhanced insulin secretion and the role of lactogenic hormones*. *Horm Metab Res*, 1997. **29**(6): p. 301-7.
106. Allagnat, F., D. Martin, D.F. Condorelli, G. Waeber and J.A. Haefliger, *Glucose represses connexin-36 in insulin-secreting cells*. *J Cell Sci*, 2005. **118**(Pt 22): p. 5335-44.
107. Kutlu, B., A.K. Cardozo, M.I. Darville, M. Kruhoffer, N. Magnusson, T. Orntoft and D.L. Eizirik, *Discovery of gene networks regulating cytokine-induced dysfunction and apoptosis in insulin-producing INS-1 cells*. *Diabetes*, 2003. **52**(11): p. 2701-19.
108. Carvalho, C.P., R.B. Oliveira, A. Britan, J.C. Santos-Silva, A.C. Boschero, P. Meda and C.B. Collares-Buzato, *Impaired beta-cell-beta-cell coupling mediated by Cx36 gap junctions in prediabetic mice*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2012. **303**(1): p. E144-51.
109. Lumelsky, N., O. Blondel, P. Laeng, I. Velasco, R. Ravin and R. McKay, *Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets*. *Science*, 2001. **292**(5520): p. 1389-94.
110. Meda, P., A. Perrelet and L. Orci, *Increase of gap junctions between pancreatic beta-cells during stimulation of insulin secretion*. *J Cell Biol*, 1979. **82**(2): p. 441-48.

111. Cruikshank, S.J., M. Hopperstad, M. Younger, B.W. Connors, D.C. Spray and M. Srinivas, *Potent block of Cx36 and Cx50 gap junction channels by mefloquine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(33): p. 12364-9.
112. Herbert, V., K.S. Lau, C.W. Gottlieb and S.J. Bleicher, *Coated charcoal immunoassay of insulin*. J Clin Endocrinol Metab, 1965. **25**(10): p. 1375-84.
113. Hunter, W.M. and F.C. Greenwood, *Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity*. Nature, 1962. **194**: p. 495-6.
114. Selvin, P.R., *Fluorescence resonance energy transfer*. Methods Enzymol, 1995. **246**: p. 300-34.
115. Jones, P.N., S. Paabo and S. Stein, *Amino Acid Analysis and Enzymatic Sequence Determination of Peptides by an Improved o-Phthaldialdehyde Precolumn Labeling Procedure*. J. Liquid Chromatogr., 1981. **4**: p. 565-586.
116. Vytasek, R., *A sensitive fluorometric assay for the determination of DNA*. Anal Biochem, 1982. **120**(2): p. 243-8.
117. Tarasov, A., J. Dusonchet and F. Ashcroft, *Metabolic regulation of the pancreatic beta-cell ATP-sensitive K⁺ channel: a pas de deux*. Diabetes, 2004. **53 Suppl 3**: p. S113-22.
118. Chatterton, T.A., C.H. Reynolds, N.R. Lazarus and C.I. Pogson, *Immunological and kinetic properties of pyruvate kinase in rat pancreatic islets*. Biochem J, 1982. **204**(2): p. 605-8.
119. Ashton, A.C. and Y.A. Ushkaryov, *Properties of synaptic vesicle pools in mature central nerve terminals*. J Biol Chem, 2005. **280**(44): p. 37278-88.
120. Pizarro-Delgado, J., M. Braun, I. Hernández-Fisac, R. Martín-Del-Río and J. Tamarit-Rodríguez, *Glucose promotion of GABA metabolism contributes to the stimulation of insulin secretion in beta-cells*. Biochem J, 2010. **431**(3): p. 381-9.
121. Wang, C., K. Kerckhofs, M. Van de Castele, I. Smolders, D. Pipeleers and Z. Ling, *Glucose inhibits GABA release by pancreatic beta-cells through an increase in GABA shunt activity*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006. **290**(3): p. E494-9.
122. Hernández-Fisac, I., S. Fernández-Pascual, H. Ortsater, J. Pizarro-Delgado, R. Martín del Río, P. Bergsten and J. Tamarit-Rodríguez, *Oxo-4-methylpentanoic acid directs the*

- metabolism of GABA into the Krebs cycle in rat pancreatic islets.* Biochem J, 2006. **400**(1): p. 81-9.
123. Stridh, M.H., M. Tranberg, S.G. Weber, F. Blomstrand and M. Sandberg, *Stimulated efflux of amino acids and glutathione from cultured hippocampal slices by omission of extracellular calcium: likely involvement of connexin hemichannels.* J Biol Chem, 2008. **283**(16): p. 10347-56.
124. Iglesias, R., S. Locovei, A. Roque, A.P. Alberto, G. Dahl, D.C. Spray and E. Scemes, *P2X7 receptor-Pannexin1 complex: pharmacology and signaling.* Am J Physiol Cell Physiol, 2008. **295**(3): p. C752-60.
125. Eskandari, S., G.A. Zampighi, D.W. Leung, E.M. Wright and D.D. Loo, *Inhibition of gap junction hemichannels by chloride channel blockers.* J Membr Biol, 2002. **185**(2): p. 93-102.
126. Gomes, P., S.P. Srinivas, W. Van Driessche, J. Vereecke and B. Himpens, *ATP release through connexin hemichannels in corneal endothelial cells.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005. **46**(4): p. 1208-18.
127. Pearson, R.A., N. Dale, E. Llaudet and P. Mobbs, *ATP released via gap junction hemichannels from the pigment epithelium regulates neural retinal progenitor proliferation.* Neuron, 2005. **46**(5): p. 731-44.
128. Shi, Y., J. Kanaani, V. Menard-Rose, Y.H. Ma, P.Y. Chang, D. Hanahan, A. Tobin, G. Grodsky and S. Baekkeskov, *Increased expression of GAD65 and GABA in pancreatic beta-cells impairs first-phase insulin secretion.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2000. **279**(3): p. E684-94.
129. Cotrina, M.L., J.H. Lin, A. Alves-Rodrigues, S. Liu, J. Li, H. Azmi-Ghadimi, J. Kang, C.C. Naus and M. Nedergaard, *Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(26): p. 15735-40.
130. Maechler, P., H. Wang and C.B. Wollheim, *Continuous monitoring of ATP levels in living insulin secreting cells expressing cytosolic firefly luciferase.* FEBS Lett, 1998. **422**(3): p. 328-32.
131. Wellershaus, K., J. Degen, J. Deuchars, M. Theis, A. Charollais, D. Caille, B. Gauthier, U. Janssen-Bienhold, S. Sonntag, P. Herrera, P. Meda and K. Willecke, *A new conditional*

- mouse mutant reveals specific expression and functions of connexin-36 in neurons and pancreatic beta-cells.* Exp Cell Res, 2008. **314**(5): p. 997-1012.
132. Rutter, G.A., *Nutrient-secretion coupling in the pancreatic islet beta-cell: recent advances.* Mol Aspects Med, 2001. **22**(6): p. 247-84.
133. Ashcroft, F.M., D.E. Harrison and S.J. Ashcroft, *Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells.* Nature, 1984. **312**(5993): p. 446-8.
134. Henquin, J.C., *ATP-sensitive K⁺ channels may control glucose-induced electrical activity in pancreatic B-cells.* Biochem Biophys Res Commun, 1988. **156**(2): p. 769-75.
135. Ivarsson, R., R. Quintens, S. Dejonghe, K. Tsukamoto, P. in 't Veld, E. Renstrom and F.C. Schuit, *Redox control of exocytosis: regulatory role of NADPH, thioredoxin, and glutaredoxin.* Diabetes, 2005. **54**(7): p. 2132-42.
136. Jensen, M.V., J.W. Joseph, S.M. Ronnebaum, S.C. Burgess, A.D. Sherry and C.B. Newgard, *Metabolic cycling in control of glucose-stimulated insulin secretion.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008. **295**(6): p. E1287-97.
137. MacDonald, M.J., A.D. Smith, 3rd, N.M. Hasan, G. Sabat and L.A. Fahien, *Feasibility of pathways for transfer of acyl groups from mitochondria to the cytosol to form short chain acyl-CoAs in the pancreatic beta cell.* J Biol Chem, 2007. **282**(42): p. 30596-606.
138. Ronnebaum, S.M., M.V. Jensen, H.E. Hohmeier, S.C. Burgess, Y.P. Zhou, S. Qian, D. MacNeil, A. Howard, N. Thornberry, O. Ilkayeva, D. Lu, A.D. Sherry and C.B. Newgard, *Silencing of cytosolic or mitochondrial isoforms of malic enzyme has no effect on glucose-stimulated insulin secretion from rodent islets.* J Biol Chem, 2008. **283**(43): p. 28909-17.
139. Jensen, M.V., J.W. Joseph, O. Ilkayeva, S. Burgess, D. Lu, S.M. Ronnebaum, M. Odegaard, T.C. Becker, A.D. Sherry and C.B. Newgard, *Compensatory responses to pyruvate carboxylase suppression in islet beta-cells. Preservation of glucose-stimulated insulin secretion.* J Biol Chem, 2006. **281**(31): p. 22342-51.
140. Ronnebaum, S.M., O. Ilkayeva, S.C. Burgess, J.W. Joseph, D. Lu, R.D. Stevens, T.C. Becker, A.D. Sherry, C.B. Newgard and M.V. Jensen, *A pyruvate cycling pathway involving cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase regulates glucose-stimulated insulin secretion.* J Biol Chem, 2006. **281**(41): p. 30593-602.

141. Odegaard, M.L., J.W. Joseph, M.V. Jensen, D. Lu, O. Ilkayeva, S.M. Ronnebaum, T.C. Becker and C.B. Newgard, *The mitochondrial 2-oxoglutarate carrier is part of a metabolic pathway that mediates glucose- and glutamine-stimulated insulin secretion*. J Biol Chem, 2010. **285**(22): p. 16530-7.
142. Hutton, J.C., A. Sener, A. Herchuelz, I. Atwater, S. Kawazu, A.C. Boschero, G. Somers, G. Devis and W.J. Malaisse, *Similarities in the stimulus-secretion coupling mechanisms of glucose- and 2-keto acid-induced insulin release*. Endocrinology, 1980. **106**(1): p. 203-19.
143. MacDonald, M.J. and L.A. Fahien, *Glyceraldehyde phosphate and methyl esters of succinic acid. Two "new" potent insulin secretagogues*. Diabetes, 1988. **37**(7): p. 997-9.
144. Meglasson, M.D. and F.M. Matschinsky, *Pancreatic islet glucose metabolism and regulation of insulin secretion*. Diabetes Metab Rev, 1986. **2**(3-4): p. 163-214.
145. Dukes, I.D., M.S. McIntyre, R.J. Mertz, L.H. Philipson, M.W. Roe, B. Spencer and J.F. Worley, 3rd, *Dependence on NADH produced during glycolysis for beta-cell glucose signaling*. J Biol Chem, 1994. **269**(15): p. 10979-82.
146. Eto, K., S. Suga, M. Wakui, Y. Tsubamoto, Y. Terauchi, J. Taka, S. Aizawa, M. Noda, S. Kimura, H. Kasai and T. Kadowaki, *NADH shuttle system regulates K(ATP) channel-dependent pathway and steps distal to cytosolic Ca²⁺ concentration elevation in glucose-induced insulin secretion*. J Biol Chem, 1999. **274**(36): p. 25386-92.
147. Eto, K., Y. Tsubamoto, Y. Terauchi, T. Sugiyama, T. Kishimoto, N. Takahashi, N. Yamauchi, N. Kubota, S. Murayama, T. Aizawa, Y. Akanuma, S. Aizawa, H. Kasai, Y. Yazaki and T. Kadowaki, *Role of NADH shuttle system in glucose-induced activation of mitochondrial metabolism and insulin secretion*. Science, 1999. **283**(5404): p. 981-5.
148. Martens, G.A., L. Jiang, K. Verhaeghen, J.B. Connolly, S.G. Geromanos, G. Stange, L. Van Oudenhove, B. Devreese, K.H. Hellemans, Z. Ling, C. Van Schravendijk, D.G. Pipeleers, J.P. Vissers and F.K. Gorus, *Protein markers for insulin-producing beta cells with higher glucose sensitivity*. PLoS One, 2010. **5**(12): p. e14214.
149. Han, X., S. Ramanadham, J. Turk and R.W. Gross, *Reconstitution of membrane fusion between pancreatic islet secretory granules and plasma membranes: catalysis by a protein constituent recognized by monoclonal antibodies directed against glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1414**(1-2): p. 95-107.

150. Mertz, R.J., J.F. Worley, B. Spencer, J.H. Johnson and I.D. Dukes, *Activation of stimulus-secretion coupling in pancreatic beta-cells by specific products of glucose metabolism. Evidence for privileged signaling by glycolysis.* J Biol Chem, 1996. **271**(9): p. 4838-45.
151. Cline, G.W., *Fuel-Stimulated Insulin Secretion Depends upon Mitochondria Activation and the Integration of Mitochondrial and Cytosolic Substrate Cycles.* Diabetes Metab J, 2011. **35**(5): p. 458-65.
152. Stark, R., F. Pasquel, A. Turcu, R.L. Pongratz, M. Roden, G.W. Cline, G.I. Shulman and R.G. Kibbey, *Phosphoenolpyruvate cycling via mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase links anaplerosis and mitochondrial GTP with insulin secretion.* J Biol Chem, 2009. **284**(39): p. 26578-90.
153. Sugden, M.C. and S.J. Ashcroft, *Phosphoenolpyruvate in rat pancreatic islets: a possible intracellular trigger of insulin release?* Diabetologia, 1977. **13**(5): p. 481-6.
154. Kennedy, H.J., A.E. Pouli, E.K. Ainscow, L.S. Jouaville, R. Rizzuto and G.A. Rutter, *Glucose generates sub-plasma membrane ATP microdomains in single islet beta-cells. Potential role for strategically located mitochondria.* J Biol Chem, 1999. **274**(19): p. 13281-91.
155. MacDonald, M.J., L.A. Fahien, R.J. Mertz and R.S. Rana, *Effect of esters of succinic acid and other citric acid cycle intermediates on insulin release and inositol phosphate formation by pancreatic islets.* Arch Biochem Biophys, 1989. **269**(2): p. 400-6.
156. Mukala-Nsengu, A., S. Fernández-Pascual, F. Martín, R. Martín-del-Río and J. Tamarit-Rodríguez, *Similar effects of succinic acid dimethyl ester and glucose on islet calcium oscillations and insulin release.* Biochem Pharmacol, 2004. **67**(5): p. 981-8.
157. Ashcroft, S.J. and M.R. Christie, *Effects of glucose on the cytosolic ration of reduced/oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate in rat islets of Langerhans.* Biochem J, 1979. **184**(3): p. 697-700.

