



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

**Esta tesis doctoral contiene un índice que enlaza a cada uno de los capítulos de la misma.**

**Existen asimismo botones de retorno al índice al principio y final de cada uno de los capítulos.**

**[Ir directamente al índice](#)**

**Para una correcta visualización del texto es necesaria la versión de [Adobe Acrobat Reader 7.0](#) o posteriores**

**Aquesta tesi doctoral conté un índex que enllaça a cadascun dels capítols. Existeixen així mateix botons de retorn a l'índex al principi i final de cadascun dels capítols .**

**[Anar directament a l'índex](#)**

**Per a una correcta visualització del text és necessària la versió d' [Adobe Acrobat Reader 7.0](#) o posteriors.**

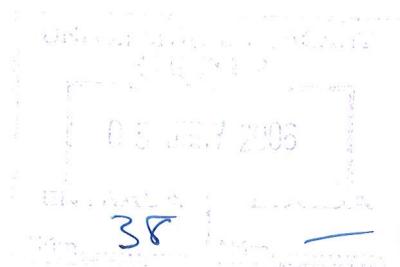
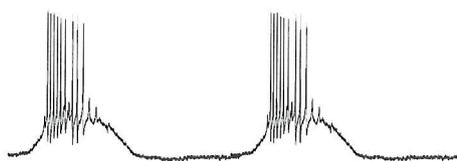


Departament de  
Biotecnologia

Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA  
UNIVERSIDAD DE ALICANTE

**EFECTO DEL BLOQUEO INTERCELULAR EN LA  
ACTIVIDAD OSCILATORIA SÍNCRONA  
EN SISTEMAS BIOLÓGICOS:  
CÉLULA  $\beta$  PANCREÁTICA.**



**Memoria presentada por Sergio Soriano Úbeda  
para optar al grado de Doctor**

Director: Juan Vicente Sánchez Andrés



Alicante, junio de 2006



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



Departament de  
Biotecnologia

Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

D. JUAN VICENTE SÁNCHEZ ANDRÉS, Catedrático de Fisiología de la  
Universidad de La Laguna,

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de investigación titulado: “ EFECTO DEL BLOQUEO INTERCELULAR EN LA ACTIVIDAD OSCILATORIA SÍNCRONA EN SISTEMAS BIOLÓGICOS: CÉLULA  $\beta$  PANCREÁTICA”, presentado por D. Sergio Soriano Úbeda para optar al grado de Doctor, ha sido realizado bajo su dirección y supervisión y que se encuentra en condiciones de ser presentado para su defensa ante un Tribunal.

Para que así conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Alicante a 31 de mayo de dos mil seis.

Fdo. Juan Vicente Sánchez Andrés

## Agraïments.

Darrere del llarg i costós camí que ha suposat la creació d'aquesta Tesi hi ha hagut molta gent que m'ha donat ànims i ha suportat els meus desànims. Vull, primer que tot, demanar disculpes per si em deixe a algú pel camí.

Al meu director de Tesi, Dr. Juan Vicente Sánchez Andrés, per donar-me l' oportunitat d'introduir-me en aquest món de l'electrofisiologia i transmetre'm els seus coneixements, així com pels ànims que en tot moment m'ha oferit, tan personals com laborals. Moltes gràcies, Juanvi.

Als doctors Àngel Nadal, Cristina Ripoll i Salvador Sala, per obrir-me les portes dels seus laboratoris i pel suport moral tan gran que m'han donat al llarg d'aquest camí incert.

A Pablo Juan i Paloma Alonso, que sense el seu ajut molts dels experiments no hagueren sigut possible. Gràcies per totes les tardes que hem passat junts en aquell laboratori de Sant Joan. No ho oblidaré mai.

A Joan Nàcher per confiar en mi i ser el primer en obrir-me les portes de la ciència.

A Quico i Gregori, amics i companys de feina a València, per demostrar que l'amistat no entén de distàncies.

A Encarna, Carmen, Esther i Lucía per fer-me sentir com un membre més del seu laboratori i per preocupar-se tant per mi.

A Jesús Giménez, el meu "pare d'Alacant". Si hi ha algú que ha estat al meu costat durant tot aquest temps i del qual estaré eternament agraït ha de ser a ell. Moltes gràcies per tot.

A tota la "pandilla basura": Salva, Simó, Josep, Pepe, Loli, Marc, Campos, Carlos i Ana, per escoltar-me i recolzar-me en tots els aspectes de la meua vida i saber que sempre estareu ahí passe el que passe. No canvieu mai, sou fantàstics.

A Mónica i Sílvia, per ser testigues de tota la meua carrera i donar-me tant de suport.

A Rafa, Pere, Raquel, Imma, Laura i Anna, per tot el que vam compartir en aquelles aules de la facultat on vam començar.

A Vanesa, llum d'esperança en l'obscuritat, per tot el que significa per a mí, per demostrar-me el seu amor en tot moment i saber que podia comptar en ella en els moments que més ho necessitava.

Especialment als meus germans i cunyats, que sense el seu suport no hagués arribat on estic ara. Gràcies.

A Andreu, Sergi, Pau i Miquel, petites gotes plenes de vida.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

Als meus pares, donadors de vida,  
sense els quals no haguera aconseguit tot el que tinc  
especialment al meu pare,  
que se que estarà ben orgullós de mi allà on estiga.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

**“La ciencia es respecto del alma lo que es la  
luz respecto de los ojos, y si las raíces son  
amargas , los frutos son muy dulces”**

*ARISTÓTELES*



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## ABREVIATURAS

Ach	Acetilcolina
AMP <sub>c</sub>	Adenosín-3',5'-monofosfato cíclico
ATP	Adenosín-5'-trifosfato
Ba <sup>2+</sup>	Bario
BSA	Albúmina bovina
Ca <sup>2+</sup>	Calcio
CbCh	Carbacol
Cd <sup>2+</sup>	Cadmio
Co <sup>2+</sup>	Cobalto
DAG	Diacilglicerol
DC	Potencial continuo
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
I <sub>CRAC</sub>	Canal no selectivo cuya corriente es transportada por sodio y potasio <sup>+</sup>
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trifosfato
K <sup>+</sup> <sub>ATP</sub>	Canal de potasio dependiente de ATP
K <sup>+</sup> <sub>Ca</sub>	Canal de potasio dependiente de calcio
K <sub>m</sub>	Constante de Michaelis
K <sup>+</sup> <sub>v</sub>	Canal de potasio dependiente de voltaje
Na <sup>+</sup>	Sodio
NADH	Nicotinamida adenin dinucleótido (forma reducida)
PIP2	Fosfatidil inositol 4,5-bifosfato
PKC	Proteína quinasa C
PLC	Fosfolipasa C
TEA	Tetraetilamonio
TPS	Potenciación temporal de la sensibilidad ( <i>temporal potentiation of the sensitivity</i> )
TTX	Tetrodotoxina

## ANGLICISMOS

<i>Burst</i>	Ráfaga de potenciales de acción
<i>Bridge</i>	Técnica de registro en modo puente
<i>Gap-junctions</i>	Uniones intercelulares en hendidura
<i>Patch-clamp</i>	Técnica de registro de parche
<i>Whole-cell</i>	Técnica de registro en parche en la célula entera



Se presentaron comunicaciones relacionadas con la tesis en el siguiente congreso:

Título: Dependence of de novo protein synthesis in the temporal potentiation of the sensitivity in pancreatic beta cells.

Autores: R. Pomares, E. Andreu, S. Soriano & J. V. Sánchez-Andrés.

Congreso: XXXII International Joint Meeting of Physiology of The SECF.

Lugar y fecha: Tenerife, febrero 2003.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## **ÍNDICE**

**1. INTRODUCCIÓN**

El PÁNCREAS ENDOCRINO.....	4
1.1. La célula $\beta$ pancreática como sistema de estudio.....	7
1.1.1. Comunicaciones intercelulares en el islote de Langerhans.....	7
1.1.2. Canales iónicos presentes en la célula $\beta$ pancreática.....	9
- Canales de potasio.....	10
- Canales de calcio.....	12
- Canales de sodio.....	13
- Canales no selectivos.....	14
1.1.3. Calcio citosólico.....	14
1.1.4. Actividad eléctrica en la célula $\beta$ pancreática.....	16
- Patrón normal de respuesta eléctrica a glucosa.....	17
- Canales iónicos en la célula $\beta$ pancreática y la generación de la actividad eléctrica.....	21
1.1.5. Acoplamiento estímulo-secreción.....	24
- Mensajeros intracelulares.....	26
1.1.6. El sistema nervioso parasimpático en la regulación de la secreción de insulina.....	28
- Regulación colinérgica de la secreción.....	29
1.2. Efecto del acoplamiento celular en el islote pancreático.....	31
1.3. Planteamiento del problema e hipótesis del trabajo.....	33
1.4. Objetivos.....	35
<b>2. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	
2.1. Medios de perfusión y reactivos.....	37
2.2. Obtención de islotes.....	39
2.3. La cámara experimental. Sistema de perfusión y termostatación.....	41
2.4. Microelectrodos.....	43
2.5. Registro electrofisiológico.....	46
2.6. Señales de calcio intracelular: microscopia de fluorescencia.....	51
2.7. Análisis de los resultados.....	55

**3. RESULTADOS**

3.1. Acoplamiento celular y aparición del patrón oscilatorio en la célula $\beta$ pancreática.	59
3.1.1. Diseño de los protocolos experimentales.....	60
3.2. Respuesta eléctrica a la acción de los bloqueantes de las gap junctions.....	63
3.2.1. Patrón eléctrico en presencia de 9 mM glucosa.....	63
3.2.2. Patrón eléctrico en presencia de 9 mM glucosa y 1 mM heptanol.....	67
3.2.3. Patrón eléctrico en presencia de 9 mM glucosa y 2 mM heptanol.....	70
3.2.4. Patrón eléctrico en presencia de 9 mM glucosa y 3 mM heptanol.....	73
3.2.5. Reversibilidad del proceso.....	74
3.2.6. Distribuciones de frecuencias.....	74
3.2.7. Resistencias de entrada celular.....	78
3.3. Registro de las oscilaciones de calcio intracelular mediante sondas fluorescentes...	81
3.3.1. Influencia del heptanol sobre las oscilaciones de calcio.....	89
3.4. Influencia del acoplamiento en la potenciación de la respuesta eléctrica de la célula $\beta$ pancreática.....	92
3.4.1. Potenciación de la respuesta eléctrica de la célula $\beta$ pancreática.....	92
3.4.2. Cuantificación de la potenciación.....	95
3.4.3. Papel del acoplamiento celular en la potenciación eléctrica de la célula $\beta$ pancreática.....	96

**4. DISCUSIÓN**

4.1. Importancia del acoplamiento celular en la aparición de patrones oscilatorios.....	103
4.1.1. El bloqueo de la comunicación intercelular impide la aparición del patrón oscilatorio en la célula $\beta$ pancreática.....	104
4.1.2. Las oscilaciones de calcio intracelular modifican su regularidad en función del tamaño del grupo celular.....	112
4.1.3. El acoplamiento celular es necesario para la aparición de la potenciación en la célula $\beta$ pancreática.....	115
4.2. Contexto fisiológico.....	119

**5. CONCLUSIONES.....** 122**6. BIBLIOGRAFÍA.....** 125

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Imagen fluorimétrica del islote de Langerhans de ratón.....	5
<b>Figura 2.</b> Uniones en hendidura ( <i>gap junctions</i> ).....	8
<b>Figura 3.</b> Patrón de respuesta eléctrica típico de la célula $\beta$ pancreática.....	18
<b>Figura 4.</b> Fases de la actividad oscilatoria.....	19
<b>Figura 5.</b> Incremento actividad / incremento glucosa.....	21
<b>Figura 6.</b> Modelo de secreción de insulina estimulada por glucosa.....	25
<b>Figura 7.</b> Esquema de la hidrólisis de fosfoinosítidos.....	27
<b>Figura 8.</b> Detalle del sistema de termostatización y perfusión.....	42
<b>Figura 9.</b> Representación esquemática del sistema de registro del voltaje.....	47
<b>Figura 10.</b> Representación del sistema de registro electrofisiológico.....	48
<b>Figura 11.</b> Fotografía del sistema de registro intracelular.....	50
<b>Figura 12.</b> Espectro de excitación del Fura-2 AM en función de la concentración de $\text{Ca}^{2+}$ libre.....	52
<b>Figura 13.</b> Estructura química del Fura-2 AM.....	52
<b>Figura 14.</b> Diseño del protocolo experimental utilizado.....	62
<b>Figura 15.</b> Oscilaciones del potencial de membrana en la célula $\beta$ pancreática en respuesta a una concentración estimuladora de glucosa.....	63
<b>Figura 16.</b> Espigas de $\text{Ca}^{2+}$ superpuestas en un <i>burst</i> control.....	64
<b>Figura 17.</b> Distribución poblacional de espigas.....	65
<b>Figura 18.</b> Actividad oscilatoria sincrona en dos células registradas mediante el registro doble intracelular.....	66
<b>Figura 19.</b> Efecto de 1mM heptanol sobre la actividad oscilatoria.....	67
<b>Figura 20.</b> Homogeneización de las espigas de $\text{Ca}^{2+}$ debido a la acción de 1mM heptanol.....	68
<b>Figura 21.</b> Registro doble simultáneo de dos células $\beta$ pancreáticas en presencia del bloqueante 1mM heptanol.....	69
<b>Figura 22.</b> Registro intracelular en presencia de 2mM heptanol.....	70
<b>Figura 23.</b> Actividad eléctrica en presencia de 2mM heptanol.....	71

<b>Figura 24.</b> Registro doble simultáneo de dos células $\beta$ pancreáticas en presencia de 2mM heptanol.....	72
<b>Figura 25.</b> Registro intracelular de una célula $\beta$ pancreática en presencia de 3mM heptanol...	73
<b>Figura 26.</b> Efecto del heptanol sobre la frecuencia de distribución de las espigas.....	76
<b>Figura 27.</b> Diseño experimental utilizado para medir la resistencia de entrada celular.....	79
<b>Figura 28.</b> Deflexiones en el potencial de membrana debidas a la aplicación de pulsos de corriente aplicados para determinar la resistencia de entrada celular.....	80
<b>Figura 29.</b> Registro de las oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$ mediante la sonda fluorescente Fura-2.....	83
<b>Figura 30.</b> Cultivo de células pancreáticas.....	84
<b>Figura 31.</b> Registro mediante sonda fluorescente de una célula $\beta$ pancreática aislada.....	85
<b>Figura 32.</b> Registro mediante sonda fluorescente fura-2 AM de un cluster de dos células.....	86
<b>Figura 33.</b> Registro mediante sonda fluorescente de un cluster compuesto por cuatro células $\beta$ pancreáticas.....	87
<b>Figura 34.</b> Registro mediante sonda fluorescente de un cluster de diecinueve células.....	88
<b>Figura 35.</b> Influencia del heptanol a distintas concentraciones sobre las oscilaciones de calcio intracelular.....	89
<b>Figura 36.</b> Efecto del heptanol sobre la sincronidad de las oscilaciones de calcio dentro de un mismo islote.....	91
<b>Figura 37.</b> Protocolo utilizado para analizar la variabilidad de la respuesta a glucosa.....	93
<b>Figura 38.</b> Respuesta típica de la célula $\beta$ al protocolo de carbacol en presencia de glucosa....	94
<b>Figura 39.</b> Comparación entre la despolarización obtenida antes y después de la aplicación de carbacol mediante el análisis de las áreas comprendidas entre una línea base y el nivel de potencial de la célula durante el tiempo que dura el pulso de glucosa.....	95
<b>Figura 40.</b> Protocolo utilizado para comprobar la existencia de potenciación en la célula $\beta$ pancreática en presencia de bloqueantes de las gap junctions.....	97
<b>Figura 41.</b> Respuesta de la célula $\beta$ al protocolo de carbacol en presencia de glucosa y 1mM heptanol.....	98

<b>Figura 42.</b> Comparación entre la despolarización obtenida antes y después de la aplicación de carbacol en presencia de 1mM heptanol mediante el análisis de las áreas comprendidas entre una línea base y el nivel de potencial de la célula durante el tiempo que dura el pulso de glucosa.....	99
<b>Figura 43.</b> Respuesta de la célula $\beta$ al protocolo de carbacol en presencia de glucosa y 3mM heptanol.....	100
<b>Figura 44.</b> Comparación entre la despolarización obtenida antes y después de la aplicación de carbacol en presencia de 3mM heptanol.....	101

### Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Relación de los distintos tipos celulares presentes en los islotes de Langerhans.....	6
<b>Tabla 2.</b> Tabla resumen de los distintos tipos de canales iónicos presentes en la célula $\beta$ pancreática.....	9
<b>Tabla 3.</b> Comparación de las amplitudes de las espigas en situación control y tratamiento.....	77



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## **1. INTRODUCCIÓN**

Claude Bernard, fisiólogo francés del siglo diecinueve, formuló por primera vez el concepto de homeostasis. Destacó que un individuo vive en dos ambientes: el ambiente exterior que nos rodea y, el más importante, un *milieu interieur*. Este ambiente interno es un compartimiento fluido que baña las células de nuestro cuerpo. Bernard observó que este fluido está producido y controlado por el organismo. Este fisiólogo creía que los organismos se hacen más independientes de los cambios en el medio externo al mantener constante su propio medio interno. Los ajustes homeostáticos, sin embargo, no son invariables, dependen de la hora del día, época del año, estado del desarrollo, edad y estado reproductivo del animal.

Existen mecanismos reguladores específicos que son los responsables de ajustar los sistemas orgánicos para mantener esta homeostasis. Cada célula del cuerpo, cada tejido y cada aparato desempeñan un importante papel en la homeostasis, por tanto, el mantenimiento de un ambiente interno entre los márgenes fisiológicos es necesario para el funcionamiento de las distintas células de tejidos y órganos.

Un ejemplo, que ilustra el control homeostático de los constituyentes metabólicos y minerales de la sangre lo constituye la homeostasis de la glucosa. Los carbohidratos y en especial la glucosa, son una fuente de energía para la mayoría de los organismos vivos. Tejidos como el cerebro necesitan glucosa de manera constante. Bajas concentraciones de ella pueden llevar a convulsiones. De la misma manera concentraciones elevadas y persistentes de glucosa ocasionan ceguera, fallo renal y enfermedad vascular periférica crónica. Por lo tanto, es importante que la glucemia se mantenga dentro de un rango adecuado.

Los humanos mantienen una concentración precisa de glucosa en sangre, que en condiciones normales oscila alrededor de 80-120mg/ml ( 4.4-6.6 mM). Hay muchos factores que afectan los niveles circulantes de glucosa; factores tales como ingestión de alimento, velocidad de digestión, metabolismo, excreción, ejercicio, estado psicológico, y

estado reproductor. Estas influencias, individualmente, o en combinación, afectan constantemente los procesos fisiológicos que regulan los niveles plasmáticos de glucosa. El nivel de glucosa puede caer momentáneamente, debido a la actividad muscular, especialmente si la ingestión de alimento está limitada. Esta disminución en el nivel de glucosa es de alguna manera detectada por ciertas células del páncreas, especialmente las células  $\alpha$  de los *islotos de Langerhans*. Estas células pueden entonces liberar glucagón, una hormona que actúa sobre las células del hígado provocando la liberación de glucosa. De esta forma el nivel de glucosa vuelve otra vez a la normalidad.

Si, por otra parte, se eleva el nivel de glucosa en sangre, como suele ocurrir tras una comida, otras células de los islotes pancreáticos, las células  $\beta$ , liberan la hormona insulina. La insulina induce la captación de glucosa de la sangre por las células hepáticas y otros tipos celulares. De esta forma se disminuye el nivel de glucosa hasta la concentración normal.

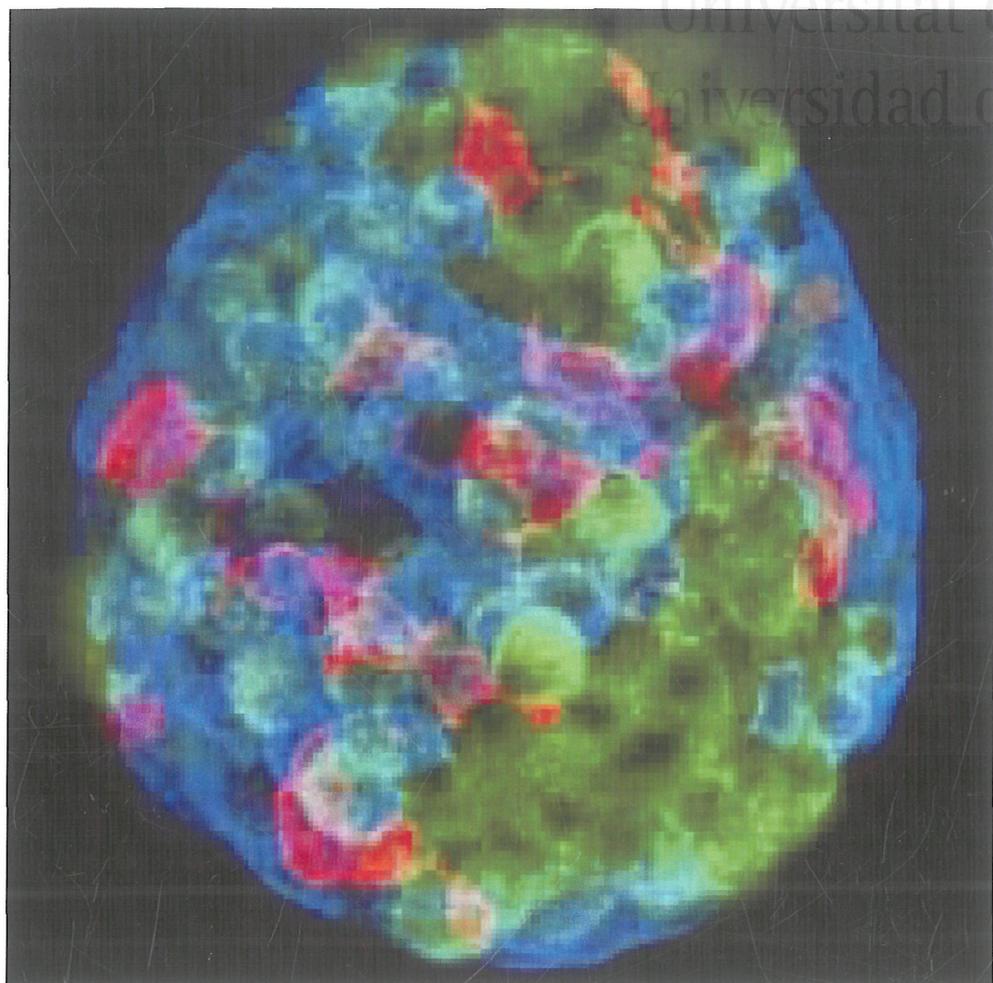
El control de la glucemia se ejerce de manera estricta en un intervalo de valores óptimos para nuestro organismo (*normoglucemia*), lo que resulta imprescindible para el buen funcionamiento del sistema nervioso, que necesita un aporte continuo de glucosa, único sustrato energético que utilizan las neuronas en condiciones normales. En el límite superior hablamos de *hiperglucemia* (concentración de glucosa en sangre superior a 7.8 mM) y en el límite inferior de *hipoglucemia* (concentración de glucosa en sangre inferior a 2.5 mM). La necesidad de un mantenimiento de la homeostasis de glucosa en sangre dentro de unos rangos estrictos produce que estados permanentes fuera de estos límites puedan tener efectos graves para el organismo. Así, cuando se produce un déficit de insulina o una respuesta inadecuada de la misma, ocurren una serie de alteraciones metabólicas que conducen a una situación de hiperglucemia, que es responsable de la sintomatología aguda de la *diabetes mellitus*.

## EL PÁNCREAS ENDOCRINO.

El páncreas es una glándula mixta anexa al duodeno compuesta por elementos de naturaleza endocrina y exocrina. Se trata de una glándula arracimada, que se puede descomponer sucesivamente en lobulillos secundarios, lobulillos primitivos y acinos. Estos elementos están separados por tejido conjuntivo, en cuyo interior se encuentran repartidos unos corpúsculos especiales, los islotes de Langerhans. Son estructuras formadas por miles de células, muy innervadas e irrigadas por capilares sanguíneos. Su función principal es la regulación de la homeostasis de la glucosa en sangre (figura 1).

La porción exocrina, representada por los *acini glandulares*, se encarga de las síntesis y secreción del jugo pancreático que se vierte al duodeno durante la digestión. El páncreas endocrino está constituido por islotes de tejido dispersos entre una masa mucho mayor que el páncreas exocrino (descrito primeramente por Langerhans en 1869), y se encarga de la síntesis y secreción de varias hormonas, entre otras la insulina, el glucagón, la somatostatina y el polipéptido pancreático.

Hay aproximadamente de 1 a 2 millones de islotes de Langerhans distribuidos entre los componentes exocrinos de un páncreas humano normal, pero sólo representan alrededor del 1 al 2 % del tejido pancreático adulto. Los islotes están constituidos fundamentalmente por cuatro tipos celulares (Orci *et al.*, 1973; Ashcroft & Rorsman, 1989) (tabla 1).



**Figura 1.** Imagen fluorométrica del islote de Langerhans de ratón. Células  $\beta$ : verdes; células  $\alpha$ : azules; células  $\delta$ : rojas. Tomado de: R.L. Sorenson y T.C. Brelje, University of Minnesota

## TIPOS CELULARES, HORMONAS QUE SECRETAN Y SU NÚMERO RELATIVO EN LOS ISLOTES PANCREÁTICOS

<u>Tipos celulares</u>	<u>Porcentaje de células en el islote</u>	<u>Hormona secretada</u>	<u>Papel de la hormona</u>
Células alfa ( $\alpha$ )	20-25	Glucagón	Regula la vía anabólica del metabolismo
Células ( $\beta$ )	70-80	Insulina	Regula la vía catabólica del metabolismo
Células delta ( $\delta$ )	<10	Somatostatina	Regula la motilidad gástrica de la secreción de hormonas intestinales
Células PP	<10	Polipéptido Pancreático	Regula los procesos digestivos

**Tabla 1.** Relación de los distintos tipos celulares presentes en los islotes de Langerhans del páncreas, su proporción así como la función de los productos de secreción.

## **1.1. LA CÉLULA BETA PANCREÁTICA COMO SISTEMA DE ESTUDIO.**

Casi todos los estudios han sido realizados en la célula  $\beta$  pancreática, por el interés que suscita el conocimiento del control de la glucosa en sangre. Esta célula actúa como un sensor de glucosa (aunque también de otros azúcares y aminoácidos) que ante incrementos en sangre responde con la liberación de insulina. La población de célula  $\beta$  constituye un 80% de la población total del islote. Estas células se acoplan mediante uniones en hendidura, de modo que el islote se comporta como un sincitio en términos de actividad eléctrica, de  $[Ca^{2+}]_i$  y secreción hormonal. Este acoplamiento dota al sistema de un alto grado de coordinación de la señal. Disfunciones del sistema pueden degenerar en patologías como la diabetes mellitus y algunas formas de obesidad.

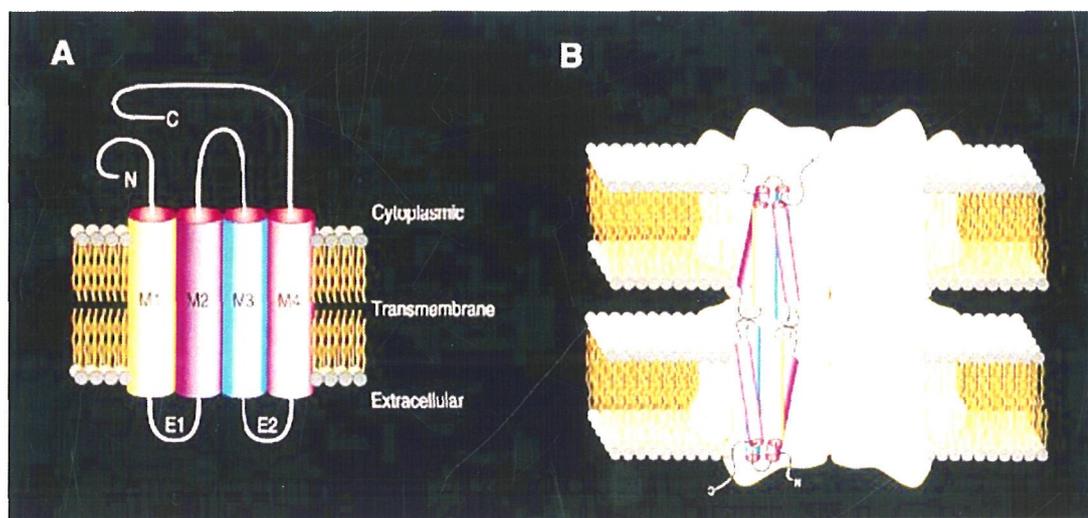
### **1.1.1. Comunicaciones intercelulares en el islote de Langerhans.**

Se conoce bien el hecho de que existe una gran heterogeneidad en la respuesta a la glucosa cuando se analizan las células  $\beta$  pancreáticas aisladas. En cambio, cuando forman parte del islote, la respuesta individual heterogénea se convierte en un patrón único homogéneo con un comportamiento oscilatorio (Jonkers *et al.*, 1999) en términos de actividad eléctrica, calcio intracelular y liberación de insulina. Las ventajas de un sistema oscilatorio son múltiples: se evita la desensibilización y se permite una mayor modulación en frecuencia, duración y amplitud (Soria, 1998). Esta propiedad procede de la existencia de unos mecanismos que permiten la sincronización de las células del islote para transmitir la señal.

Las células  $\beta$  en el islote de Langerhans se encuentran eléctricamente acopladas a través de unos canales intercelulares que dotan de continuidad citoplasmática con respecto a los iones y a las moléculas pequeñas. Estos canales reciben el nombre de uniones en

hendidura, o *gap junctions* (figura 2) y parecen jugar un papel importante en la sincronización del islote para transmitir la señal.

De hecho se ha demostrado que la conductancia de acoplamiento celular oscila simultáneamente con las oscilaciones del potencial de membrana (Andreu *et al.*, 1997). En modelos computacionales del islote simulando el comportamiento oscilatorio se ha observado que los tipos celulares no  $\beta$  podrían estar contribuyendo en establecer una retroalimentación negativa al sistema, lo que facilitaría la modulación de las oscilaciones entre sus límites fisiológicos (Andreu *et al.*, 1997; Soria, 1998).



**Figura 2.** Uniones en hendidura (gap junction)

### 1.1.2. Canales iónicos presentes en la célula $\beta$ pancreática.

En la membrana plasmática de la célula  $\beta$  pancreática se han descrito los siguientes canales:

Canal	Propiedades	Bibliografía
$K_{ATP}$	Bloqueado por ATP Bloqueado por sulfonilureas Activado por diazóxido	Dunne <i>et al</i> , 1986 Atwater <i>et al</i> , 1986
$K_{Ca}$	Activado por $Ca^{2+}$ y por voltaje	Cook <i>et al</i> , 1984
Maxi K	Bloqueado por caribdotoxina	Bokvist <i>et al</i> , 1990
Small K	Bloqueado por apamina	
$K_v$ (rectificador tardío)	Activado por voltaje Bloqueado por TEA, quinina	Rorsman <i>et al</i> 1986
$Ca^{2+}$ (tipo L)	Activado por voltaje Inactivación rápida dependiente de $Ca^{2+}$ Inactivación lenta dependiente de voltaje	Achcroft <i>et al</i> , 1990
$Na^+$	Inactivado al potencial de reposo	Plant, 1988
$I_{CRAC}$	Activado por depleción de los depósitos de $Ca^{2+}$	Bertram <i>et al</i> , 1995

**Tabla 2.** Tabla resumen de los distintos tipos de canales iónicos presentes en la célula  $\beta$  pancreática.

### Canales de potasio

#### a) Canal de potasio dependiente de ATP ( $K^+_{ATP}$ )

Los canales de potasio dependientes de ATP están presentes en las células  $\beta$  pancreáticas de todas las especies y se encuentran en otros tipos celulares, como músculo esquelético, músculo liso, músculo cardíaco y en los axones de los vertebrados.

El canal de potasio dependiente de ATP juega un papel importante en la respuesta de la célula  $\beta$  pancreática a secretagogos. En ausencia de glucosa o para unas concentraciones subumbrales (0-6 mM), la permeabilidad dominante es la debida al canal de potasio regulado por ATP. Substratos del metabolismo de la célula  $\beta$  pancreática producen una disminución de la actividad del canal, reversible y dosis-dependiente, que conduce a la despolarización de la membrana y al inicio de la actividad eléctrica en dicho sistema.

Otros nutrientes como manosa, leucina, gliceraldehído y alfa-cetoisocaproato poseen la característica común de metabolizarse y producir un aumento del ATP intracelular y todos ellos pertenecen a la categoría de iniciadores de la secreción de insulina. Es, por tanto, un canal regulado metabólicamente cuyas propiedades lo convierten en firme candidato a sensor de glucosa en las células  $\beta$  pancreáticas y posiblemente en otras células como las hipotalámicas de la sensación de hambre y de saciedad.

La actividad del canal de  $K^+_{ATP}$  de la célula  $\beta$  está regulada por el cociente ATP/ADP (Atwater *et al.*, 1979; Dunne & Petersen, 1986; Larsson *et al.*, 1996), inhibiéndose al aumentar la concentración intracelular de ATP. Se ha postulado que el ADP compite por el sitio de unión de los nucleótidos y reduce la eficiencia del ATP como inhibidor. El ATP intracelular posee tres efectos básicos sobre el canal: Bloqueo (la forma activa es el ADP libre), modulación ( $ATP-Mg^{2+}$ ) y reactivación (Ripoll *et al.*, 1996). La

propiedad más característica de este canal es el bloqueo por ATP intracelular. El ATP interactúa con un sitio específico asociado al canal. Concentraciones milimolares provocan el bloqueo total del canal. Se ha demostrado recientemente que otros nucleótidos, como los diadenosín polifosfatos, podrían actuar como segundos mensajeros mediando el bloqueo de  $K_{ATP}$  inducido por glucosa en la célula  $\beta$  (Ripoll *et al.*, 1996). Este canal está también regulado por pH y por el  $Mg^{2+}$ .

La conductancia del canal único medida en parches escindidos en un medio simétrico (140 mM  $K^+$ ) está entre 50 y 80 pS. En condiciones fisiológicas el canal está sujeto a una fuerte inhibición ya que en reposo sólo se encuentra activado en proporciones inferiores al 25% de la conductancia total. Esta activación es la que mantiene el potencial de membrana próximo al potencial del equilibrio del  $K^+$  (Ashcroft *et al.*, 1984; Ashcroft & Rorsman, 1990)

b) Canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  y por voltaje: ( $K_{Ca}$ )

Se trata de un canal que está prácticamente inactivo al potencial de reposo, se activa por la despolarización y por el aumento de la concentración de calcio intracelular (Cook & Hales, 1984; Tabcharani & Mislser, 1989). Posee una conductancia de canal único medida en parches escindidos de 200-250 pS expuestos a un medio simétrico de 150mM KCl. Asimismo el aumento de glucosa inhibe a este canal por mecanismos diferentes a los estudiados con el canal que depende de ATP. La probabilidad de apertura de este canal disminuye con la acidificación y aumenta con la alcalinización del medio intracelular.

La actividad de este canal aumenta cuando la concentración de calcio intracelular está aumentada debido a una despolarización de la célula  $\beta$  pancreática expuesta a una concentración de potasio de 31 mM. Ya que la concentración de calcio citoplasmático está elevada bajo estas condiciones, similares a las encontradas durante la estimulación con

glucosa, es posible que el canal de  $K^+$  activado por  $Ca^{2+}$  esté implicado en la repolarización de las espigas (Henquin, 1990; Kukuljan *et al.*, 1991).

En la célula  $\beta$  este canal es bloqueado por caribdotoxina y tetraetilamonio (TEA) a concentraciones relativamente bajas (Bokvist *et al.*, 1990) que no afectan al canal de  $K^+_{ATP}$ . También el  $Ba^{2+}$  es un buen bloqueador del canal.

#### c) Rectificador tardío ( $K_V$ )

Es un canal dependiente de voltaje, que está activado por despolarización (mediante la técnica de whole-cell, esta corriente se observa a potenciales superiores a  $-30$  mV). Posee una conductancia de canal único alrededor de  $15.5$  pS ( $145$  mM  $K^+$ ).

Esta corriente aumenta linealmente con la despolarización y se bloquea por TEA, quinina y forskolina. Se ha descrito en “whole-cell” y no se modifica por la concentración de  $Ca^{2+}$  o de ATP en el citosol. Esta corriente parece participar en la generación de los potenciales de acción (Rorsman & Trube, 1986).

#### Canales de calcio

En las células  $\beta$  de rata se han descrito dos tipos de canales de calcio dependientes de voltaje (Ashcroft & Rorsman, 1990), con propiedades similares a las de los canales tipo L y tipo T. No parece que el canal tipo T juegue un papel importante en la actividad de la célula  $\beta$  ya que este canal no está presente en las células  $\beta$  de ratón (Plant, 1988; Rorsman *et al.*, 1988)

La conductancia del canal de calcio tipo L está en torno a los  $2$  pS en concentraciones fisiológicas de  $Ca^{2+}$  ( $2.6$  mM). La corriente de este canal se activa por potenciales de membrana superiores a  $-60$  mV. Las corrientes de calcio son máximas en

torno a los  $-20$  mV y de magnitud suficiente como para explicar por sí solas la despolarización del potencial de acción. La inactivación de las corrientes durante un pulso de voltaje mantenido implica dos procesos: una inactivación rápida dependiente de calcio, debida a la entrada previa de calcio y una inactivación lenta, dependiente de voltaje con constantes de tiempo del orden de segundos. Las corrientes de entrada son bloqueadas por nifedipina, nitrendipina,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Cd}^{2+}$ , y son activadas por Bay-k8644 y CGP 283892. Los canales de calcio en la célula  $\beta$  son 1.5-2 veces más permeables al  $\text{Ba}^{2+}$  que al  $\text{Ca}^{2+}$ .

### Canal de sodio

La célula  $\beta$  pancreática de rata y ratón posee una corriente rápida de entrada que puede ser identificada como debida a la corriente a través del canal de sodio en función de los siguientes parámetros: se bloquea por TTX  $1 \mu\text{M}$ , tiene un potencial de inversión cercano al potencial de equilibrio del  $\text{Na}^+$  y se inactiva rápidamente. La dependencia de voltaje difiere de la de la corriente de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . Se activa para potenciales de membrana superiores a  $-30$  mV. Mientras que la corriente de calcio se activa para potenciales de membrana superiores a  $-50$  mV. Un rasgo peculiar de esta corriente de entrada es la dependencia de voltaje del proceso de inactivación. En la célula  $\beta$  la conductancia al sodio está completamente inactivada al potencial de reposo. El componente de entrada sólo se activa si el potencial de membrana es más negativo, o igual a  $-110$  mV. El papel que la corriente de sodio pueda jugar en el proceso de acoplamiento excitación-secreción continúa siendo un enigma.

Se trata de un canal sensible a TTX, sin embargo, el único efecto que produce la TTX es un retraso en la aparición de la actividad eléctrica y de la secreción de insulina cuando el islote es sometido a un cambio brusco de 0 a 10 mM glucosa. Ni la actividad eléctrica ni la secreción de insulina en estado estacionario se modifican por TTX. Puede pensarse que participa en los cambios que tienen lugar en el islote cuando es estimulado con una concentración estimuladora de glucosa.

### Canales no selectivos: Canal $I_{CRAC}$

Recientemente se ha descrito una nueva corriente en la célula  $\beta$  a la que se ha denominado CRAC (calcium release activated current). Esta corriente parece ser transportada por  $\text{Na}^+$  y por  $\text{K}^+$  (persiste en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ ) y sería la responsable de los efectos despolarizantes de la Ach y otros agonistas muscarínicos. La existencia de esta corriente explicaría no sólo el efecto de los agentes muscarínicos, sino también otros fenómenos como la respuesta bifásica de la célula  $\beta$  a los cambios en la concentración de glucosa y los efectos despolarizantes de la taspigargina (Bertram *et al.*, 1995). En otros tipos celulares, la función de esta corriente sería rellenar los depósitos intracelulares, por el siguiente mecanismo: cuando el retículo endoplasmático libera  $\text{Ca}^{2+}$ , se genera un segundo mensajero que difunde hasta la membrana plasmática donde abre canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Así al aumentar la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  los depósitos intracelulares pueden rellenarse (Takemura *et al.*, 1989). En las células  $\beta$  el rellenado del retículo endoplasmático tendría lugar de forma indirecta a través de la apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje resultante de la despolarización inducida por la CRAC (Bertram *et al.*, 1995).

#### **1.1.3. Calcio citosólico.**

La apertura de canales de calcio en la membrana plasmática provoca la entrada masiva de calcio arrastrado por el gradiente de concentración y el potencial de membrana. Mediante la utilización de sondas fluorescentes que modifican sus propiedades de absorción y/o emisión en función de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  como por ejemplo quin-2, fura-2 o indo-1, puede seguirse la evolución del calcio intracelular, así como hacer una estimación de sus valores en reposo.

La concentración aproximada de  $\text{Ca}^{2+}$  que se ha estimado en el citosol de la célula  $\beta$  en reposo está en el intervalo detectado en otras células, es decir entre 50 y 200 nM. La

concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol está regulada finamente no sólo por mecanismos de transporte presentes en la membrana del retículo endoplasmático, mitocondrias y, probablemente, gránulos de secreción. Los mecanismos más importantes son:

- Entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el espacio extracelular a través de los canales de calcio.
- Extrusión de calcio hacia el espacio extracelular, mediante: a) una bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  que depende de  $\text{Mg}^{2+}$ , consume ATP y se activa por  $\text{Ca}^{2+}$  por el que posee alta afinidad ( $K_m = 0.1-0.5 \mu\text{M}$ ) y opera, por lo tanto, en condiciones fisiológicas, y b) un intercambiador  $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$  conducido por el gradiente de  $\text{Na}^+$  y el potencial de membrana.
- Reservorios intracelulares: retículo endoplasmático, mitocondrias y gránulos de secreción.

Cuando se aumenta la glucosa de niveles basales a niveles estimuladores, los cambios en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  siguen un patrón bifásico característico (Valdeolmillos *et al.*, 1989; Valdeolmillos *et al.*, 1993; Bertram *et al.*, 1995; Soria *et al.*, 1996):

- Pocos minutos después de la estimulación con glucosa hay un aumento brusco hasta un nivel de fase inicial, que dura 2-3 minutos.
- Tras esta primera fase la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  comienza a oscilar entre dos niveles. Estas oscilaciones tienen el mismo período y frecuencia que las ráfagas de actividad eléctrica. En presencia de concentraciones intermedias de glucosa (7-11mM) el calcio libre intracelular oscila con una frecuencia y duración similar (2-5  $\text{min}^{-1}$ ) a la de las oscilaciones del potencial de membrana (Santos *et al.*, 1991). Las oscilaciones inducidas por glucosa dependen del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular: desaparecen en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular y se bloquean por verapamil 100 $\mu\text{M}$ .

A nivel celular, si las células están aisladas se pierde este comportamiento oscilatorio para el islote, de manera que la respuesta mayoritaria a aumentos de glucosa se convierten en aumentos sostenidos de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  si bien un porcentaje menor de células

responden con patrones oscilatorios heterogéneos e irregulares (Theler *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1997). Cuando se monitoriza el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular a nivel subcelular se pueden observar respuestas a la glucosa totalmente polarizadas y restringidas a dominios espaciales locales (Bokvist *et al.*, 1995; Martin *et al.*, 1997; Bokvist *et al.*, 2000).

#### 1.1.4. Actividad eléctrica en la célula $\beta$ pancreática.

La excitabilidad es una propiedad que tradicionalmente se ha considerado restringida a las células nerviosas y musculares. Sin embargo, se ha podido comprobar que algunas células endocrinas, entre ellas las pancreáticas, son capaces de generar potenciales de acción, y de modificar su potencial de membrana en presencia de ciertos secretagogos. Éstos pueden dividirse en dos grupos principales:

- *Iniciadores*: son capaces de estimular la liberación de insulina por sí mismos e incluye a los nutrientes que se metabolizan en la célula  $\beta$  pancreática, sustancias que estimulan el metabolismo endógeno y varios agentes farmacológicos. Todos ellos actúan de forma similar, cerrando los canales  $\text{K}^+$   $\text{ATP}$ , despolarizando la célula  $\beta$  pancreática e iniciando la actividad eléctrica.
- *Potenciadores*: de la liberación de insulina, tales como hormonas, neurotransmisores y agentes farmacológicos. Estos secretagogos requieren de la presencia de concentraciones subestimuladoras de un iniciador. La mayoría de los potenciadores incrementan la actividad eléctrica de la célula  $\beta$  pancreática.

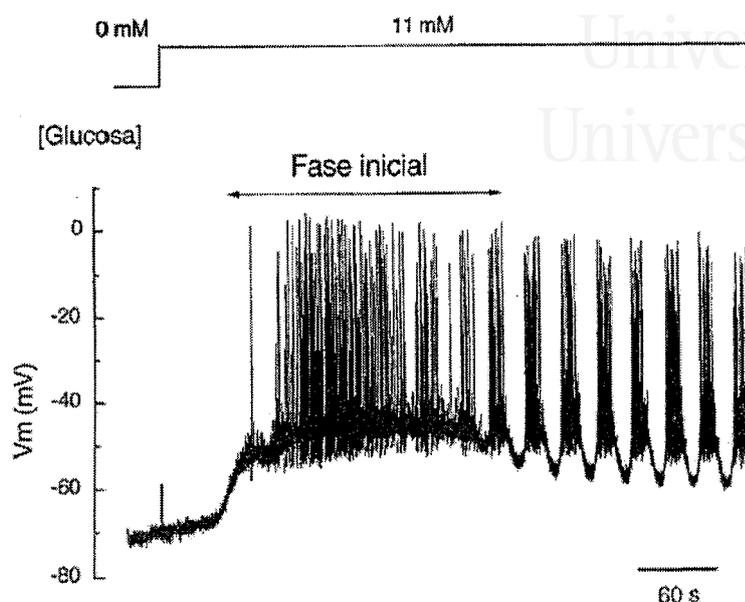
La actividad eléctrica de la célula  $\beta$  pancreática juega un papel muy importante en el acoplamiento estímulo-secreción. Dean y Matthews fueron los primeros en registrar la actividad eléctrica en dicha célula usando un microelectrodo insertado en la misma (Dean & Matthews, 1968). Este fue el inicio de una amplia serie de estudios que llevaron a la caracterización de la respuesta eléctrica de la célula  $\beta$ . La generalización de las técnicas de patch-clamp, ha permitido caracterizar las corrientes iónicas que subyacen a esta actividad

eléctrica, permitiendo la comprensión de los mecanismos de secreción de insulina estimulada por nutrientes y agentes farmacológicos. Una de las mayores contribuciones fue la identificación de los canales sensibles a glucosa y ATP ( $K^+_{ATP}$ ) (Ashcroft *et al.*, 1984; Cook & Hales, 1984) y la demostración que este canal es también la diana de la acción terapéutica de las sulfonilureas (Sturgess *et al.*, 1985), cosa que ha permitido establecer la relación entre el metabolismo de la glucosa y los fenómenos eléctricos de las membranas.

#### Patrón normal de respuesta eléctrica a glucosa.

La mayoría de los estudios realizados en célula  $\beta$  pancreática han sido realizados mediante el uso de microelectrodos intracelulares dentro del islote de Langerhans. No obstante, se pueden obtener resultados similares mediante el uso de la técnica de patch-clamp en células aisladas de ratón, rata o islotes pancreáticos humanos (Smith *et al.*, 1990).

En un medio con concentración de glucosa subestimuladora (inferior a 3-5mM), la célula  $\beta$  está eléctricamente silente, con un potencial de reposo estable entorno a los -70mV. El aumento de la glucosa extracelular produce una despolarización lenta cuya medida es dependiente de la concentración de glucosa. Para niveles de glucosa que inducen la secreción de insulina (>7 mM) la despolarización es suficiente para alcanzar el potencial umbral ( $\approx$  -50 mV) a partir del cual la actividad oscilatoria se inicia (figura 3).



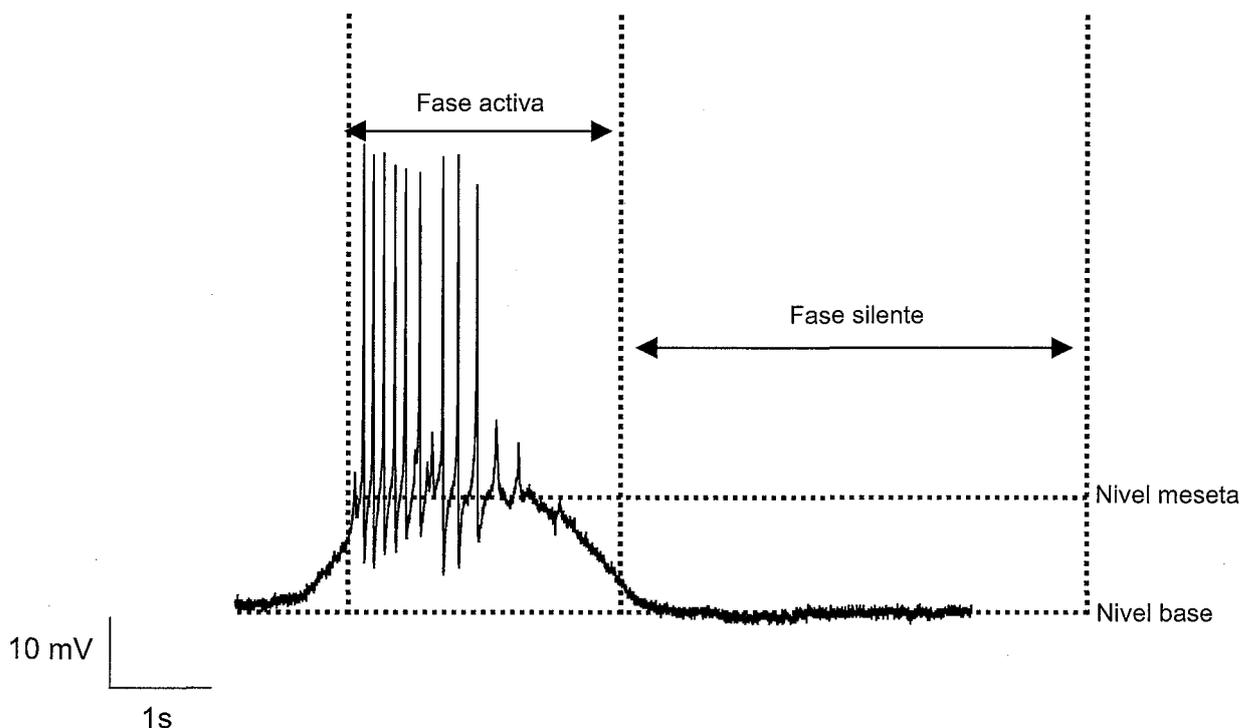
**Figura 3.** Patrón de respuesta eléctrica típico de la célula  $\beta$  pancreática

Cuando se aplica glucosa a un medio que ha estado desprovisto de ella se produce la siguiente secuencia:

- a) *Fase inicial:* Tras una despolarización desde el potencial de reposo, la célula alcanza un potencial de membrana suficiente para permitir la activación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje. Se produce un espiguo continuo durante un intervalo que varía entre 20-60 s, transcurrido el cual la célula se repolariza de nuevo y se entra en la siguiente fase de actividad, donde el potencial de membrana de la célula oscila entre dos niveles.
- b) *Fase de actividad oscilatoria:* la actividad oscilatoria de la célula  $\beta$  sigue un patrón característico de oscilaciones lentas en el potencial de membrana, en el cual, los potenciales de acción se superponen. Nos referimos a estas oscilaciones con el término inglés *burst* (o ráfaga de potenciales). Cada *burst* comienza con una rápida despolarización hasta el

pico del potencial de acción y entonces repolariza al potencial de meseta o *plateau* (-30, -40 mV). La frecuencia de los potenciales de acción disminuye a lo largo del *burst*, y finalmente la membrana se repolariza hasta un nivel, en el que permanece unos segundos, hasta que se produce una nueva despolarización que llega al nivel de meseta con génesis de nuevas espigas, y así sucesivamente, en tanto se mantiene el nivel de glucosa, generando un patrón característico de oscilaciones lentas.

La estricta periodicidad de las oscilaciones del potencial de membrana registrado para un rango de glucosa por encima de 7 mM, nos permite considerar dos fases en la actividad eléctrica de la célula  $\beta$  pancreática: *fase activa o despolarizada* durante la cual se producen las espigas de calcio, y *fase silente o hiperpolarizada* (figura 4).



**Figura 4.** Fases de la actividad oscilatoria

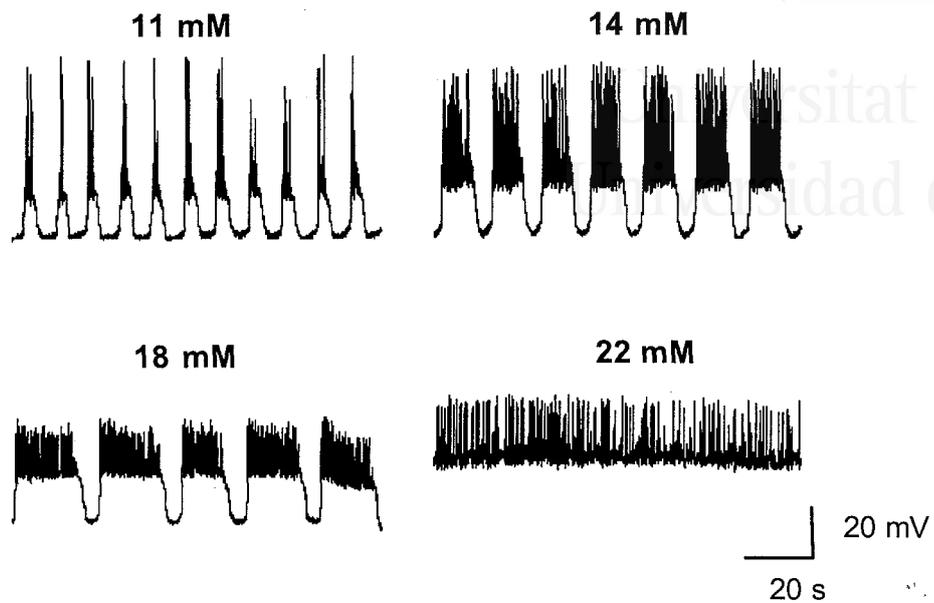
Este patrón normal de respuesta a la glucosa registrado en islotes de Langerhans *in vitro*, se ha demostrado también *in vivo* en condiciones fisiológicas (Sanchez-Andres *et al.*, 1995). En estudios tanto *in vivo* como *in vitro*, se ha observado que los potenciales de acción son calcio dependientes, y que existen diferencias entre la sensibilidad a la glucosa, siendo ésta mayor *in vivo*. Esto demuestra la importancia de las influencias humorales y nerviosas a la hora de determinar la sensibilidad de la célula  $\beta$ .

Las oscilaciones del potencial de membrana observadas *in vivo* son sincronas entre las diferentes células de un mismo islote, y asíncrona entre los distintos islotes del mismo páncreas (Valdeolmillos *et al.*, 1996).

Para un rango de glucosa por encima de 8 mM conviene hacer algunas observaciones:

- a) La primera fase tras la aplicación de glucosa suele ser de mayor duración que las siguientes.
- b) En las fases silentes, el potencial de membrana no es mantenido, sino que tiene lugar una lenta despolarización hasta llegar al umbral en que se inicia la fase activa (Meissner, 1976).
- c) Los potenciales de acción que tienen lugar durante la fase activa no son homogéneos, sino que cabe distinguir varias poblaciones en base a la distribución de amplitudes (Soria & Ferrer, 1986).

Una vez alcanzado el patrón oscilatorio, a medida que la concentración de glucosa aumenta se produce un incremento en la duración de los burst y el intervalo entre ellos disminuye (figura 5), es decir, se alargan las fases activas y se acortan las fases silentes (aumentando el grado de actividad de la célula). De esta forma al llegar a concentraciones de glucosa superiores a 20 mM se anulan las fases silentes y los potenciales de acción son continuos. Esta fase se denomina *actividad continua*.



**Figura 5.** Incremento actividad / incremento glucosa

### Canales iónicos en la célula $\beta$ pancreática y la generación de la actividad eléctrica.

La mayoría de los registros sobre la actividad eléctrica se han realizado en la célula  $\beta$  pancreática de ratón. Existe un gran número de modelos matemáticos que intentan describir dicha actividad asumiendo las contribuciones relativas de cada canal en la aparición del patrón oscilatorio.

Es sabido que en ausencia de glucosa el potencial de reposo de la célula  $\beta$  pancreática se mantiene en unos niveles cercanos al potencial de equilibrio del potasio

(Meissner *et al.*, 1978). La conductancia del potasio está determinada principalmente por los canales  $K^+_{ATP}$ , demostrado por el hecho de que sólo los canales  $K^+_{ATP}$  permanecen activos en el potencial de reposo y que todas las sustancias que bloquean dicho canal despolarizan la célula  $\beta$  pancreática.

La lenta despolarización inducida por glucosa es debido al cierre de los canales  $K^+_{ATP}$ . En este estado, se alcanza un potencial de membrana suficiente como para permitir la activación de los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje. La participación de los canales de  $Na^+$  en esta fase parece poco probable, ya que permanecen completamente inactivados en el potencial de meseta y la TTX no influye en el potencial de acción.

La duración del potencial de meseta o *plateau* está regida por al menos tres corrientes: la corriente de  $Ca^{2+}$ , las corrientes de salida debidas a canal  $K^+_V$  y  $K^+_{Ca}$  y la corriente de  $K^+_{ATP}$ . Sólo pequeños cambios en cualquiera de esas tres corrientes producirán un efecto marcado en el potencial de membrana. La iniciación de los potenciales de acción durante el *burst* es debido al balance entre las corrientes de salida ( $K^+_V$  y  $K^+_{Ca}$ ) y las corrientes de entrada ( $Ca^{2+}$ ). La activación de los canales  $K^+_V$  y  $K^+_{Ca}$  produce la repolarización del potencial de acción. Esta idea está apoyada por el hecho de que la aplicación de TEA, un bloqueante de los canales  $K^+_{Ca}$ , incrementa tanto la amplitud como la duración del potencial de acción (Atwater *et al.*, 1979; Henquin, 1990). La hiperpolarización que se produce tras un potencial de acción es debido a que los canales  $K_V$  no se cierran de forma instantánea, ya que la corriente de desactivación de dicho canal es lenta para potenciales de membrana de  $-40$  mV. Esto sugiere que la caída de las corrientes de salida asociada con el cierre de los canales  $K_V$  conduce a una despolarización gradual y a la generación de un nuevo potencial de acción sobre el nivel de meseta ( $-40$  mV).

El inicio y la finalización de cada *burst* se produce principalmente por el balance entre las corrientes de entrada de  $Ca^{2+}$  y las de salida de  $K^+_{ATP}$ . La corriente de  $Ca^{2+}$

disminuye lentamente con el tiempo a causa de la inactivación y se produce la finalización del *burst* cuando la corriente llega a ser demasiado pequeña para balancear la influencia hiperpolarizante de la corriente  $K^+_{ATP}$ . La rápida repolarización al final de cada *burst* se debe al cierre de los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje.

Es probable que el intervalo entre un *burst* y el siguiente se deba a la recuperación de los canales de  $Ca^{2+}$  y un nuevo *burst* se inicie cuando la corriente de  $Ca^{2+}$  sea suficiente como para contrarrestar la influencia hiperpolarizante de la corriente  $K^+_{ATP}$ .

A medida que la concentración de glucosa aumenta, la duración del *burst* aumenta y el periodo *interburst* disminuye. Teóricamente, la glucosa produce tres efectos que contribuyen a este hecho: a) una reducción de la corriente  $K^+_{ATP}$ , b) un aumento de la corriente de  $Ca^{2+}$  y c) una disminución en la velocidad de inactivación de la corriente de  $Ca^{2+}$ . No obstante, las siguientes evidencias demuestran que la regulación de la corriente de  $K^+_{ATP}$  es el principal mecanismo por el cual la glucosa modula la duración y la frecuencia del *burst*. Primero: las corrientes de  $K^+_{ATP}$  de la célula están reguladas por la glucosa en unos rangos que oscilan entre 0-15mM, aunque hay heterogeneidad en la sensibilidad de células individuales (Ashcroft & Rorsman, 1990). Segundo: en registros de célula aislada, hay una buena correlación entre la amplitud de la corriente  $K^+_{ATP}$  y la intensidad de la actividad eléctrica en la célula  $\beta$  pancreática (Ashcroft & Rorsman, 1990). Tercero: la tolbutamida es capaz de regular la actividad eléctrica de forma muy similar a la glucosa (Henquin *et al.*, 1988). Bajas concentraciones de esta droga producen la aparición de *bursts* en ausencia de glucosa, mientras que altas concentraciones provocan la aparición de actividad eléctrica continua (Henquin & Meissner, 1982).

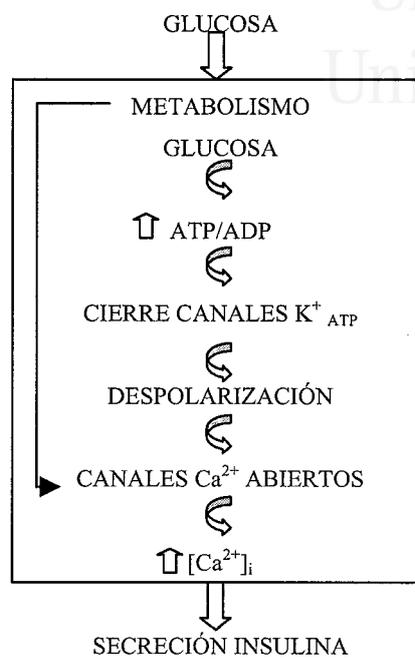
### 1.1.5. Acoplamiento estímulo-secreción.

La célula  $\beta$  pancreática actúa como sensor de la glucosa en sangre de manera que mantiene la homeostasis de la glucosa en unos niveles óptimos. La excitabilidad es una propiedad que le confiere a estas células la capacidad de generar potenciales de acción y de modificar su potencial de membrana en respuesta a la presencia de ciertos secretagogos.

La glucosa penetra a través de la membrana plasmática de la célula  $\beta$  pancreática mediante un transportador de glucosa de baja afinidad y de alta capacidad, GLUT-2 (Johnson *et al.*, 1990). Una vez en el espacio citosólico, la glucosa se incorpora a la vía glicolítica y se metaboliza a piruvato. Posteriormente el piruvato es catabolizado en el interior de la mitocondria dando lugar a ATP y NADH que se emplea en la fosforilación oxidativa para generar más moléculas de ATP.

En ausencia de glucosa, la ratio citoplasmática ATP/ADP es baja y por tanto los canales  $K^+_{ATP}$  están activos (abiertos). Cada célula  $\beta$  pancreática está equipada con cientos de canales  $K^+_{ATP}$  y el sumatorio de su actividad fija el potencial de membrana de la célula próximo al potencial de equilibrio del  $K^+$  (-70mV). En la célula  $\beta$ , además del canal de  $K^+_{ATP}$ , otros canales estarán activos en ausencia de glucosa, sin embargo son demasiado pocos para influir de forma decisiva en el potencial de membrana de la célula en reposo.

En presencia de glucosa, como consecuencia del metabolismo de la glucosa, se produce un aumento de la ratio ATP/ADP y el cierre de los canales de  $K^+_{ATP}$ . Cuando la despolarización en la célula es suficiente (>90% de los canales de  $K^+_{ATP}$  están cerrados), se produce la activación de los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje, que despolarizando más la célula producen la apertura de más canales de  $Ca^{2+}$ . Este aumento de la entrada de  $Ca^{2+}$  produce un aumento transitorio de la  $[Ca^{2+}]_i$  lo que produce la exocitosis de los gránulos de insulina (figura 6).



**Figura 6.** Modelo de secreción de insulina estimulada por glucosa

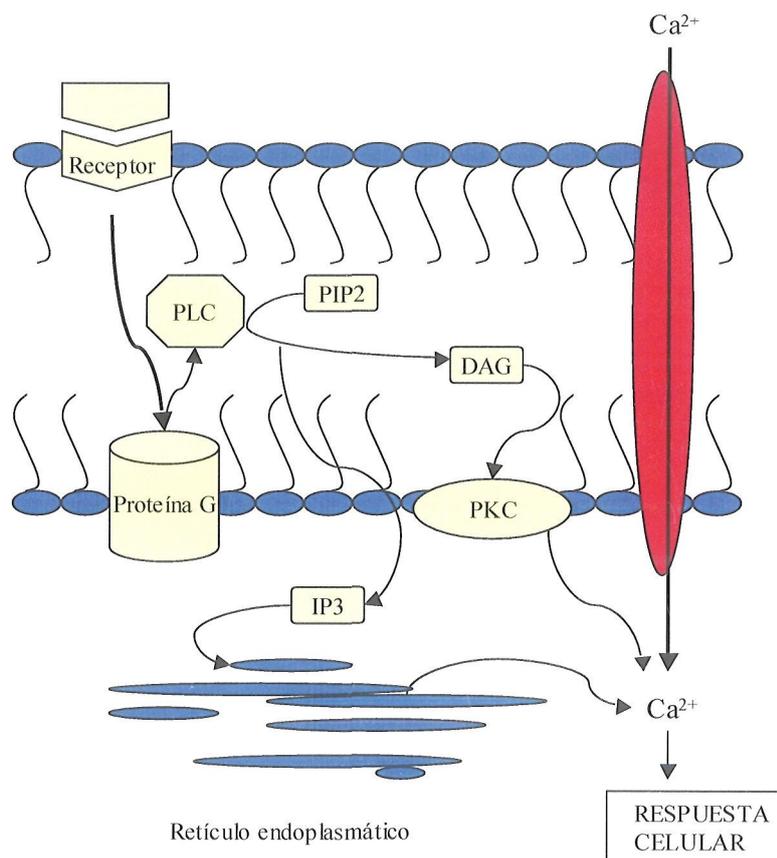
El objetivo de la actividad eléctrica de la célula  $\beta$  pancreática es por tanto el de generar la señal intracelular para iniciar la exocitosis de los gránulos de insulina.

### Mensajeros intracelulares.

En la célula  $\beta$  pancreática las señales extracelulares están mediadas por cambios en la concentración de segundos mensajeros intracelulares, existiendo una compleja interrelación entre distintos eslabones metabólicos del acoplamiento estímulo-secreción en la célula  $\beta$ .

- a) *Fosfoinosítidos*: en islotes aislados, la hidrólisis de fosfoinosítidos de membrana (presentes en la membrana plasmática de todas las células eucariotas) participa en la transducción de señales tanto extra como intracelulares que provocan la respuesta secretora de la insulina. La activación de la fosfolipasa C (figura 7), vía proteína G, produce la hidrólisis del fosfatidil inositol 4,5-bifosfato dando lugar a inositol trifosfato y diacilglicerol (Berridge, 1993). El inositol trifosfato ( $IP_3$ ) difunde hasta las reservas intracelulares de calcio donde induce la rápida liberación del ión (Prentki & Matschinsky, 1987; Berggren *et al.*, 1993); Morgan & Montague, 1992). El  $IP_3$  es rápidamente desfosforilado a inositol bifosfato. Por otra parte, el diacilglicerol (DAG) tiene entre sus funciones más importantes la de activar la proteína Kinasa C. Las consecuencias de la activación de la PKC son complejas, sin embargo parece que su principal acción es la potenciación de la respuesta secretora mediada por un iniciador de la secreción como es la glucosa (Persaud *et al.*, 1993). De este modo se inicia el descenso de dos cascadas, que implican tanto el aumento de la actividad citosólica de  $Ca^{2+}$ , lo que ocasiona la modulación de los elementos de respuesta sensibles a este ión, como la fosforilación de proteínas promovidas por  $Ca^{2+}$ /PKC. Tanto DAG como el  $IP_3$  son rápidamente metabolizados en las células, de forma que en ausencia de síntesis *de novo* los niveles celulares de estos dos

mensajeros disminuyen rápidamente; la PKC se inactiva y los niveles citosólicos de  $\text{Ca}^{2+}$  son devueltos a niveles de reposo por los sistemas de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  asociados a membrana.



**Figura 7.** Esquema de la hidrólisis de fosfoinosítidos

- b) *Calcio:* En las últimas décadas se han acumulado evidencias que implican la participación de la concentración de calcio citoplasmático en el acoplamiento estímulo-secreción en las células  $\beta$ . El aumento de calcio

citoplasmático que se produce en la cascada iónica que se desencadena tras la estimulación con glucosa de la célula  $\beta$  induce secreción de insulina (Wollheim & Pozzan, 1984).

- c) *AMP<sub>c</sub>*: El *AMP<sub>c</sub>* juega un papel importante en la regulación de la función de los islotes pancreáticos y en la liberación de insulina (Sharp, 1979). Estos efectos están mediados por la proteína Kinasa A. De este modo, la reducción del *AMP<sub>c</sub>* en las células  $\beta$  constituye una señal inhibitoria de la secreción de insulina. Esto implica la apertura de los canales  $K^+_{ATP}$  asociado con una hiperpolarización de la célula, reducción de la entrada de calcio, y por tanto reducción de la  $[Ca^{2+}]_i$  y de la actividad de la célula.

#### 1.1.6. El sistema nervioso parasimpático en la regulación de la secreción de insulina.

Es bien conocida la vinculación entre el sistema nervioso y la secreción de insulina en el páncreas endocrino (Woods & Porte, 1974), ya en su Tesis Doctoral Langerhans (1869) describió la rica inervación de los islotes. Datos a favor de esta relación se basan en experimentos que demuestran que la atropina inhibe la fase oral de la secreción de insulina (Woods *et al.*, 1972), la liberación de insulina secundaria a la estimulación vagal (Kaneto *et al.*, 1967; Kajinuma *et al.*, 1968) y la secreción de insulina en respuesta a una carga oral de glucosa, pero no a la carga intravenosa (Nelson *et al.*, 1968).

Se acepta que la secreción de insulina, al igual que la de glucagón, está influida por sustratos, hormonas y neurotransmisores (Gerich *et al.*, 1976; Smith & Porte, 1976). Las neurohormonas se pueden dividir en tres tipos: a) estimuladores (acetilcolina), b) inhibidores (somatostatina), y c) algunos pueden ser estimuladores e inhibidores (catecolaminas, serotonina, prostaglandinas).

Las hormonas son de dos categorías: aquellas que regulan la secreción endocrina directamente (la mayoría de los péptidos intestinales como la gastrina, secretina, CCK, GIP), mientras que otras como los estrógenos, tiroxina, cortisol y STH se limitan a influir sobre la sensibilidad del islote a otros reguladores primarios.

Este sistema neuroendocrino proporciona los elementos para la integración de las señales directas dadas por los sustratos con las necesidades metabólicas a corto y largo plazo determinadas por el sistema nervioso central. En este sentido durante las comidas se daría un predominio de la regulación vía sustratos, y los elementos nerviosos jugarían un papel menor, mientras que en los periodos interprandiales el papel fundamental sería para estos últimos, que jugarían un papel mayor en la modulación de la insulinemia basal y en el ajuste del funcionamiento de los islotes (Porte *et al.*, 1976)

#### Regulación colinérgica de la secreción.

Los estudios ultraestructurales de la inervación del páncreas endocrino han mostrado que los terminales simpáticos y parasimpáticos alcanzan y están estrechamente relacionados con las células del páncreas endocrino. Los islotes constituyen un ejemplo de asociación estrecha entre el tejido endocrino y nervioso, particularmente para el caso de fibras colinérgicas y célula  $\beta$  (Radke & Stach, 1986).

El microscopio electrónico ha permitido conocer con más detalle las características de la inervación del islote, de esta manera se sabe que no existe relación entre los terminales nerviosos y el tipo de célula inervada (cualquiera de los tipos celulares descritos en el islote puede recibir tres o más tipos de inervación)(Stahl, 1963).

La aplicación de atropina es la forma más extendida para caracterizar un fenómeno como muscarínico, sin embargo parece que su efecto sobre la acción vagal depende de la especie animal (Miller, 1981). Otra de las formas para comprobar el efecto muscarínico en páncreas entero es la estimulación con agentes muscarínicos. De esta forma se ha podido demostrar como los muscarínicos estimulan la secreción de insulina de forma dosis-dependiente, y en dependencia de la concentración de glucosa, de forma que para bajas concentraciones de glucosa ( $< 4-5$  mM) no se observa estimulación, mientras que el aumento de la concentración de glucosa incrementa la respuesta secretora para cada nivel colinérgico.

Los islotes son más sensibles a los agentes muscarínicos que a la glucosa, de forma que, por ejemplo, la respuesta a metacolina  $10^{-4}$ M sobre glucosa subestimuladora (2.4mM) es mayor que la obtenida con glucosa 16 mM únicamente. Este tipo de respuesta puede tener significado asociada a los estudios *in vivo* en los que se demostró que la respuesta a glucosa es mayor si se administra a través del duodeno que por vía intravenosa (Elrick *et al.*, 1964), y a los estudios del efecto de antagonistas colinérgicos sobre la secreción de insulina cefálicamente (Woods *et al.*, 1972).

La secreción de insulina, en respuesta a la estimulación colinérgica *in vitro* sigue un patrón bifásico, constando de un primer pico que dura pocos minutos y de un segundo incremento en la liberación, de carácter sostenido; siendo las relaciones dosis-respuesta para distintos colinérgicos diferentes en cada fase (Sharp, 1974).

## 1.2. EFEECTO DEL ACOPLAMIENTO CELULAR EN EL ISLOTE PANCREÁTICO.

La aparición de patrones oscilatorios es un hecho común de los sistemas excitables. Un caso particular lo encontramos en las células  $\beta$  pancreáticas. Se ha demostrado, tanto *in vivo* como *in vitro*, que la actividad eléctrica de la célula  $\beta$  pancreática es oscilatoria dentro de los rangos de concentraciones fisiológicas de glucosa (Sanchez-Andres *et al.*, 1995; Valdeolmillos *et al.*, 1996)

Meissner (1976) demostró que muchas células  $\beta$  pancreáticas estaban eléctricamente acopladas cuando formaban parte del islote. Las células  $\beta$  pancreáticas pierden su capacidad oscilatoria cuando están aisladas (Perez-Armendariz *et al.*, 1991; Smolen *et al.*, 1993). Este comportamiento puede ser debido a que el patrón oscilatorio es una propiedad emergente de un grupo de células en donde la célula  $\beta$  aislada necesita del apropiado *feedback* de las células vecinas para exhibir el patrón oscilatorio. Las células  $\beta$  aisladas presentan amplitudes de corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  menores que las presentes cuando forman parte del islote (Gopel *et al.*, 1999) y se encuentran más despolarizadas. El potencial de membrana se sitúa alrededor de  $-40$  mV, mientras que cuando forman parte del islote, su potencial de membrana se sitúa entorno a  $-70$  mV (Lebrun & Atwater, 1985). Estos factores podrían explicar que la actividad eléctrica observada en las células aisladas tenga cierto parecido con el espigero observado sobre el nivel meseta del burst en el islote entero.

Parte de las diferencias observadas entre las células  $\beta$  aisladas y los islotes puede deberse a la ausencia de acoplamiento celular. Reduciendo el acoplamiento utilizando oligonucleótidos *antisense* para la conexina se puede observar la aparición en el islote intacto de patrones muy similares a los observados en células aisladas (Zhang *et al.*, 2003).

Mediante experimentos realizados con sondas fluorescentes para medir las fluctuaciones de calcio intracelular se han obtenido resultados muy similares a los expuestos anteriormente. Numerosos estudios han revelado que el islote exhibe un patrón de oscilaciones de  $[Ca^{2+}]_i$  sincronas con la actividad eléctrica (Valdeolmillos *et al.*, 1989). Los análisis de los experimentos de  $Ca^{2+}$  han revelado que las oscilaciones de  $Ca^{2+}$  ocurren de manera sincrona en el islote, indicando que las células  $\beta$  se intercomunican rápidamente, a través de las gap junctions. Hay evidencias que apoyan la idea de que las gap junctions juegan un papel importante en el acoplamiento eléctrico y metabólico del islote. No obstante, dicho acoplamiento intercelular parece estar restringido a pequeños grupos celulares y no se excluyen otros mecanismos que sirvan para sincronizar la respuesta del islote (Perez-Armendariz & Atwater, 1986; Stokes & Rinzel, 1993)

Las gap junctions permiten la propagación de señales de una célula a otra. Se ha observado que en células aisladas las oscilaciones de  $[Ca^{2+}]_i$  suelen ser lentas e irregulares (Hellman *et al.*, 1992) y probablemente reflejando la irregularidad y heterogeneidad de la actividad eléctrica en la célula aislada (Rorsman & Trube, 1986). Modelos teóricos basados en la hipótesis de que la actividad eléctrica esté poco organizada en la célula  $\beta$  aislada debido a las fluctuaciones estocásticas de los canales iónicos predicen que las oscilaciones regulares del potencial de membrana emergen cuando las células están asociadas en clusters (Sherman *et al.*, 1988; Sherman & Rinzel, 1991). El acoplamiento entre un número pequeño de células es suficiente para observar patrones oscilatorios homogéneos. Sin embargo, el número de células  $\beta$  acopladas parece tener una gran influencia en la regularidad de las oscilaciones de  $Ca^{2+}$  inducidas por glucosa.

Por lo tanto, se puede pensar que las propiedades del islote, tales como las oscilaciones de  $Ca^{2+}$  y del potencial de membrana, así como la secreción de insulina, requieren que éste funcione como un *sincitio*.

### 1.3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS DE TRABAJO.

Existen evidencias experimentales que apuntan en la dirección de que grupos celulares conectados muestran un patrón oscilatorio, a diferencia de células aisladas. Por consiguiente se puede postular que las células podrían exhibir diferentes propiedades como una función del grado de conexión entre las mismas que sería modulable por reguladores fisiológicos, o eventualmente terapéuticos.

Se conoce desde 1968 que la célula  $\beta$  del páncreas exhibe actividad oscilatoria (Dean & Matthews, 1968). Unos años después se comprobó que las células de los islotes de Langerhans oscilan sincrónicamente y están acopladas eléctricamente *in vitro* (Meissner, 1976). Se ha demostrado que esta sincronización se da también *in vivo* (Valdeolmillos *et al.*, 1996).

Un posible papel del acoplamiento a través de uniones de tipo *gap junction* en la génesis de las oscilaciones sincronizadas fue propuesto por Rinzel *et al.*, desarrollando simulaciones computacionales en las que se utilizaba la célula  $\beta$  como modelo de oscilador y considerando las evidencias de éste y otros sistemas en los que las células aisladas no son capaces de generar descargas, sino que más bien exhiben potenciales de acción de forma irregular, aparentemente aleatoria (Sherman & Rinzel, 1991; Smolen *et al.*, 1993). En sus simulaciones comprueba que el acoplamiento es capaz de permitir y modular la expresión de actividad oscilatoria sincrona. Se ha observado la aparición de acoplamiento cuando se inicia la actividad oscilatoria a partir de un patrón no oscilatorio y la oscilación de la conductancia de acoplamiento en fase con las oscilaciones del potencial de membrana (Andreu *et al.*, 1997).

Todo ello ha conducido a considerar el papel del acoplamiento intercelular en las propiedades oscilatorias de varios sistemas, observándose que el acoplamiento modifica las propiedades de las oscilaciones e incluso condiciona su existencia, así como constituye un elemento clave en la aparición de la sincronización (Sherman & Rinzel, 1992; Manor *et al.*, 1997).

Por todo ello, se propone la siguiente HIPÓTESIS DE TRABAJO: *La comunicación intercelular a través de uniones gap tiene un papel determinante en la generación y sincronización de patrones oscilatorios en el islote de Langerhans.*

#### 1.4. OBJETIVOS.

En esta tesis se planteó como objetivo principal determinar la relación entre conexión electrotónica a través de las uniones tipo *gap* y actividad oscilatoria síncrona en la célula  $\beta$  del islote de Langerhans. Para ello se procederá al estudio de los siguientes puntos:

1. Comprobar si la alteración de la comunicación intercelular mediante bloqueantes o moduladores de uniones *gap* modifica y cómo lo hace los patrones oscilatorios síncronos.
2. Determinar si la heterogeneidad en el patrón de espigas presente en la célula  $\beta$  pancreática es consecuencia del acoplamiento celular.
3. Comprobar si se producen modificaciones en la actividad oscilatoria en función del número de células de un grupo.
4. Determinar cómo influye el acoplamiento en la potenciación de la respuesta eléctrica de la célula  $\beta$  pancreática.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## **2. MATERIAL Y MÉTODOS**

## 2.1. MEDIOS DE PERFUSIÓN Y REACTIVOS.

Como medio de perfusión para el registro intracelular se utilizó una solución Krebs modificada con la siguiente composición química:

NaCl	120 mM
NaHCO <sub>3</sub>	25 mM
KCl	5 mM
CaCl <sub>2</sub>	2.6 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM

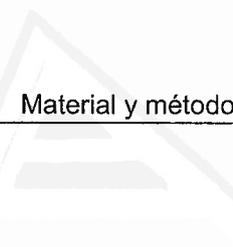
Esta solución se mantuvo gaseando continuamente con carbógeno (95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>) con el fin de mantener la oxigenación y un pH próximo a 7.4-7.5. Se le añadió las concentraciones deseadas de glucosa y/o del resto de agentes utilizados. Todas estas sales proceden de Panreac Química S.A.

Como medios de aislamiento y cultivo se utilizaron las siguientes soluciones:

1) Medio de aislamiento de los islotes (medio A):

NaCl	115 mM
KCL	5 mM
MgCl <sub>2</sub>	1.1 mM
NaHCO <sub>3</sub>	10 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.2 mM
CaCl <sub>2</sub>	2.5 mM
HEPES ácido	25 mM
glucosa	5.6 mM
1% BSA	

El pH se ajustó a 7.4.



2) Medio de aislamiento celular (medio B):

NaCl	120 mM
KCl	5 mM
MgCl <sub>2</sub>	3 mM
NaHCO <sub>3</sub>	25 mM

El pH se ajustó a 7.4.

3) Medio de cultivo celular (medio C):

RPMI 1640 suplementado con;

10 % suero fetal

100 IU/ml penicilina

0.1 mg/ml estreptomycinina

el pH se ajustó a 7.4.

Relación de reactivos utilizados.

Para el desarrollo de los experimentos se utilizaron los siguientes reactivos:

1-heptanol	1-3 mM
2-octanol	1-4 mM
Halotano	4 mM
Glicirretínico	50 $\mu$ M
Carbacol (CbCh)	50 $\mu$ M
Atropina	10 $\mu$ M

Todos los reactivos proceden de SIGMA-ALDRICH Química, S.A.

## 2.2. OBTENCIÓN DE ISLOTES.

Para la realización de los experimentos de esta tesis se utilizaron ratones OF-1 criados en el estabulario de la Facultad de Medicina. El protocolo seguido para la obtención de los islotes varía dependiendo de la técnica utilizada en cada caso.

Para el registro intracelular, los animales destinados a la obtención de los islotes de Langerhans fueron sacrificados mediante dislocación cervical. A continuación se le practica una laparotomía media completa. Seguidamente se desplaza todo el paquete intestinal desde el yeyuno a la izquierda del operador y se arrastra el bazo, extrayéndolo del abdomen; con esta maniobra se consigue arrastrar el páncreas desde su cola, observándose las porciones del recto, que se liberan seccionándolas, finalmente se secciona también el paquete vascular que se encuentra en profundidad. De esta manera se obtiene el páncreas junto al bazo y ambos se fijan con alfileres a una placa Petri con fondo de cera negra. En esta situación algunos islotes ya son visibles por transparencia a través de superficie del páncreas, insinuándose con particular claridad en la proximidad de los vasos y especialmente cerca de la arteria pancreático duodenal que discurre centralmente de cabeza a cola. A partir de este momento los islotes, cuyos diámetros oscilan entre 50 y 300  $\mu\text{m}$ , se microdisecan bajo esterolupa con instrumental microquirúrgico. Hay que tomar dos precauciones:

- a) Es necesario liberar de tejido exocrino una zona de la superficie del islote al objeto de permitir el control con estereolupa del acceso del microelectrodo al islote.
- b) Hay que preservar un pequeño halo de tejido exocrino periférico, justo en torno a la zona liberada, que permitirá la fijación del islote al fondo de la cámara de perfusión con microalfileres. Este requisito es esencial dado que cualquier movimiento del islote podría perturbar el registro.

El protocolo de obtención de islotes para el registro de las oscilaciones de calcio es muy similar al seguido para la obtención de islotes para el registro electrofisiológico.

Tras sacrificar al animal por dislocación cervical y practicarle una laparotomía media completa, se fijó el hígado mediante una gasa a la pared costal, quedándose así expuesto el conducto biliar común. Éste se ligó en su desembocadura al duodeno mientras que por una pequeña incisión practicada en la zona proximal se introdujo una aguja de insulina. A través de ésta se introdujeron 8 ml de una mezcla del medio de aislamiento (A) junto con 30 mgrs de colagenasa tipo A (actividad = 0.3 U/mg de proteína liofilizada) a 4 °C. La digestión enzimática del páncreas (Lenmark, 1974) tuvo lugar durante 10 minutos a 37 °C. Tras este período se paró la reacción enzimática mediante el medio A frío y se procedió a lavar 3 veces dejando sedimentar el digerido y eliminando el sobrenadante. Los islotes de Langerhans se obtuvieron del tejido digerido por succión con pipeta automática bajo una lupa.

#### Cultivos de células del islote.

Los islotes de Langerhans fueron dispersados en células aisladas por digestión enzimática en presencia de 0.05% tripsina y 0.02 % EDTA por tres minutos tras ser lavados 3 veces con el medio B en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . Las células fueron sembradas sobre cubreobjetos en el medio de cultivo C y se mantuvieron a 37 °C en atmósfera húmeda con 5 % de  $\text{CO}_2$  durante al menos 24 horas. En cada cubreobjetos se realizó un aro de grasa esterilizada sobre el que se incorporaron 80-100  $\mu\text{l}$  de la suspensión celular ( 50.000-60.000 células por cubreobjetos).

### **2.3. LA CÁMARA EXPERIMENTAL. SISTEMA DE PERFUSIÓN Y TERMOSTATIZACIÓN.**

El cuerpo de la cámara se fabricó a partir de un bloque de plexiglás negro para facilitar la visualización del islote. En la figura 8 se muestra con detalle la estructura de la cámara y el sistema de perfusión. La pared anterior se hizo con vidrio fino (un cubreobjetos de microscopía) para permitir la visualización sagital de la preparación con estereolupa.

El fondo de la cámara se realizó con goma de silicona de 1 mm de espesor, donde se clavan los microalfileres que mantienen fijo el islote. Las soluciones entran en la cámara a través de un conducto practicado en su parte izquierda. Dicho orificio alcanza a la cámara 4 mm por debajo del nivel al que se fija el islote, de forma que las soluciones se ven obligadas a ascender para, a continuación, alcanzar la preparación, que no se ve afectada directamente por el flujo. Seguidamente las soluciones salen por la derecha de la cámara mediante un sistema de sifón que permite el mantenimiento del nivel.

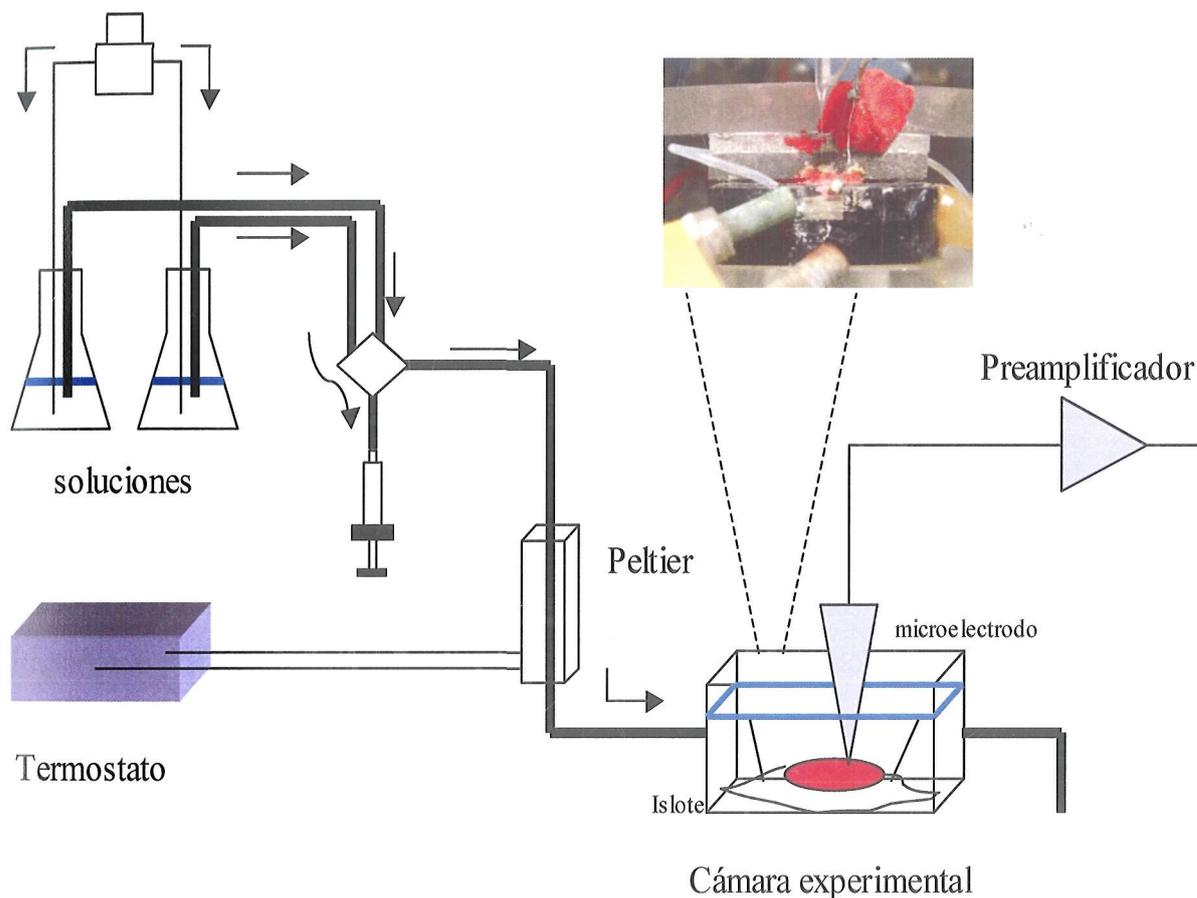
La cámara se sujeta con tornillos a la mesa de soporte del micromanipulador, asegurando su inmovilidad. El volumen de la cámara es de 40  $\mu$ l y el flujo de la solución oscila alrededor de 0.8 ml/min. Para iluminar el sistema se empleó una fibra óptica situada a la izquierda y a la misma altura que la cámara.

Las soluciones llegan a la cámara a través de dos tubos de polietileno, pudiéndose seleccionar mediante una llave la solución que perfundirá la preparación. El espacio muerto entre la llave y la cámara introduce un retraso de aproximadamente 20 segundos al acceso de las soluciones al islote.

Antes de su entrada en la cámara la solución pasa a través de un bloque de aluminio que permite su termostatación con un sistema peltier. Este sistema se ajusta de forma que

la temperatura en la cámara de las soluciones sea de 36 °C (se mide la temperatura durante todo el experimento por medio de la sonda del peltier, alojada en el fondo de la cámara de registro, junto al islote).

95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>



**Figura 8.** Detalle del sistema de termostatación y perfusión.

## 2.4. MICROELECTRODOS.

Para medir el potencial de membrana usamos microelectrodos (finos capilares de vidrio rellenos de una solución electrolítica). Los capilares empleados son de borosilicato de Sutter Instruments Co. El diámetro interno es de 1.0 mm y el diámetro externo de 2.0 mm. Estos capilares fueron estirados en un estirador de una fase (Narishige PE 2), y rellenos con una solución de citrato potásico 3 M y cloruro potásico 50 mM, previamente filtrada a través de un filtro Millipore. De esta forma obtenemos pipetas largas extremadamente flexibles, con una gran estabilidad a movimientos laterales, propiedad que es importante en este caso dado que el islote está sometido a un flujo de aproximadamente 0.8 ml/min, lo cual supone el recambio de unos 30 volúmenes por minuto, es decir se produce el recambio de todo el volumen de la cámara cada 2 segundos.

La forma más adecuada para estimar los diámetros de las puntas de los microelectrodos, cuando no se puede realizar un análisis detallado con microscopía electrónica, es la medición de su resistencia. En general, cuanto mayor sea el diámetro de la punta, menor es la resistencia eléctrica. La resistencia de los microelectrodos es muy importante por los siguientes motivos: una resistencia demasiado alta lleva consigo efectos desastrosos en el potencial de punta, en la habilidad para pasar corriente, en el ruido y en la constante de tiempo del circuito de entrada. En general, se puede asumir que cuanto menor sea la resistencia de entrada, se obtendrán mejores resultados. Asimismo, es necesario en muchos casos que el diámetro de la punta sea pequeño, por lo tanto se intenta llegar a un compromiso que posibilite el menor diámetro posible de la punta, y a la vez menor resistencia.

Las células  $\beta$  tienen un diámetro que oscila entre 6 y 15  $\mu\text{m}$ , por lo que para penetrarlas se requiere electrodos de punta muy fina, y consecuentemente de alta resistencia eléctrica, del orden de 70-120 M $\Omega$ . Con resistencias tan elevadas aumenta el potencial de

punta, aumenta la dificultad para inyectar corriente, se incrementan el ruido y las interferencias y aumenta también la constante de tiempo de entrada del circuito; pero, en cualquier caso, es el mejor compromiso al que podemos llegar.

Los potenciales de unión se originan donde quiera que dos conductores distintos entren en contacto. Los mayores potenciales de unión se dan en la unión líquido-metal que se forma en el punto en el que la entrada al amplificador contacta con el electrolito de la micropipeta, y también la unión líquido-líquido que se forma en la punta de la micropipeta (potencial de punta). La suma de todos los potenciales de unión se elimina introduciendo un potencial continuo (DC) único que alcanza a menudo unos 200 mV que se compensan fácilmente al principio del experimento con el control de offset del amplificador Axoclamp2A, que tiene capacidad para compensar desviaciones de hasta 500 mV. El problema real son los cambios de potencial de punta tras la penetración de una célula. El sentido del cambio de potencial suele ser de tal forma que normalmente incide en una subestimación del potencial de reposo. En cualquier caso esta subestimación (o sobreestimación en su caso) siempre se corrige, tras sustraer el valor obtenido al extraer tras el experimento el electrodo de la célula.

La solución interna del microelectrodo está en contacto con un electrodo de plata-plata clorurada, actuando como puente salino entre la célula y el electrodo de plata permitiendo el paso de corriente por desplazamiento de iones. El objetivo es obtener un potencial estable durante el experimento con el paso de pequeñas corrientes. Estas condiciones pueden lograrse solamente mediante la utilización de un electrodo reversible:



La función del cloruro de plata es proveer un almacén de iones cloruro y plata en forma sólida, preparado para desplazar la reacción hacia la izquierda con el paso de la electricidad. La capa de AgCl, cuya solubilidad es muy baja, no solamente funciona como

un almacén de  $\text{Ag}^+$  y  $\text{Cl}^-$  sino que también media entre la conducción electrónica en el metal ( $\text{Ag}^+ + e^- \rightarrow \text{Ag}$ ) y la corriente iónica (permitiendo el intercambio de  $\text{Cl}^-$  entre el precipitado y la solución). A un sistema de este tipo se le llama a veces electrodo de cloruro o electrodo reversible a iones cloruro. El resultado neto de la reacción en el electrodo es que puede tener lugar un flujo de carga eléctrica en ambas direcciones.

Para clorurar el electrodo se limpia éste con alcohol y se le conecta al polo positivo de una pila, cuyo polo negativo está conectado a otro hilo de plata. Ambos se introducen en una solución de HCl 0.05 M durante 2 minutos, sin permitir que se toquen, de forma que la corriente pase a través del electrolito. Si el clorurado conseguido es bueno, el electrodo habrá adquirido un color negro homogéneo, que corresponde a la capa de cloruro de plata depositada por electrólisis.

La inyección de corriente a través del microelectrodo de alta resistencia merece un comentario específico. Los conductores electrolíticos obedecen a la Ley de Ohm en el rango en el que se trabaja con microelectrodos. Debe esperarse que la relación corriente-voltaje para microelectrodos sea lineal. Desafortunadamente no es así, aunque en un intervalo restringido de voltaje la respuesta es casi lineal. Los microelectrodos de baja resistencia pueden pasar decenas de nA sin salir de la región de casi linealidad. Sin embargo a partir de los 50 M $\Omega$  los microelectrodos son marcadamente no lineales para intensidades de 1 nA e incluso inferiores. La variación de la resistencia de los microelectrodos dificulta la inyección de corriente mediante métodos convencionales y se impone la utilización de sistemas electrónicos de bombeo de corriente. Para inyectar corriente a través de los microelectrodos se necesita de circuitos especiales que permitan pasar del orden de nA a través de resistencias de centenas de M $\Omega$ . Esto se consigue con circuitos a los que se da el nombre genérico de “bombeo activo de corriente”, cuya principal característica es que la magnitud de la corriente de salida está gobernada

solamente por la señal de comando y es independiente de la impedancia conectada a la salida.

## 2.5. REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO.

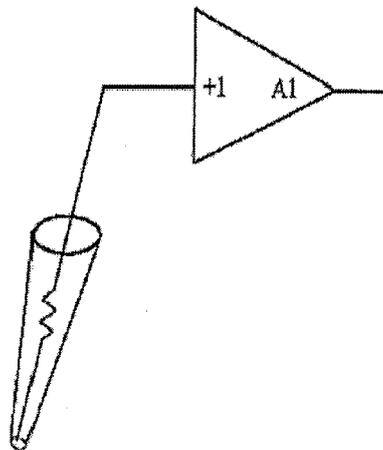
La célula  $\beta$  del islote de Langerhans responde electrofisiológicamente mediante la producción de actividad eléctrica típica en *bursts* ante la presencia de glucosa en el medio de perfusión. Por tanto el registro de la actividad eléctrica en presencia de glucosa permite distinguir la célula secretora de insulina del resto de células que integran el islote pancreático.

Una vez diseccionado el islote de Langerhans y situado en la cámara de registro, la penetración en la célula se realiza mientras se observa en el trazo del osciloscopio el potencial de salida del microelectrodo.

Cuando se intenta penetrar una célula presionando contra ella una micropipeta, la membrana celular se deforma, pero la micropipeta no logra penetrarla. Se pueden utilizar distintos métodos para solucionar este problema, el más antiguo consiste en golpear breve y ligeramente el micromanipulador. Dado que este método es difícilmente calibrable y reproducible, actualmente se emplean dos métodos electrónicos alternativos para facilitar la penetración del microelectrodo en la célula. Uno de ellos consiste en inducir una breve corriente oscilatoria de alta frecuencia a través de la micropipeta. Esto se lleva a cabo aumentando la compensación de capacitancia hasta el punto en que se induce una oscilación en el circuito de compensación. En el amplificador Axoclamp, esta labor viene simplificada por la existencia de un circuito específico: *Buzz*. Otro de los métodos electrónicos utilizados consiste en la inyección de un pulso de corriente negativo o positivo de gran amplitud en la célula. De nuevo, el amplificador Axoclamp posee un circuito que lo consigue automáticamente: *Clear*. Ambos métodos producen un cambio rápido en el

potencial en la punta del microelectrodo ( $\pm 10$  V), lo cual implica una vibración rápida de la misma que facilita la penetración (Rosario, L.M. *et al.* 1986).

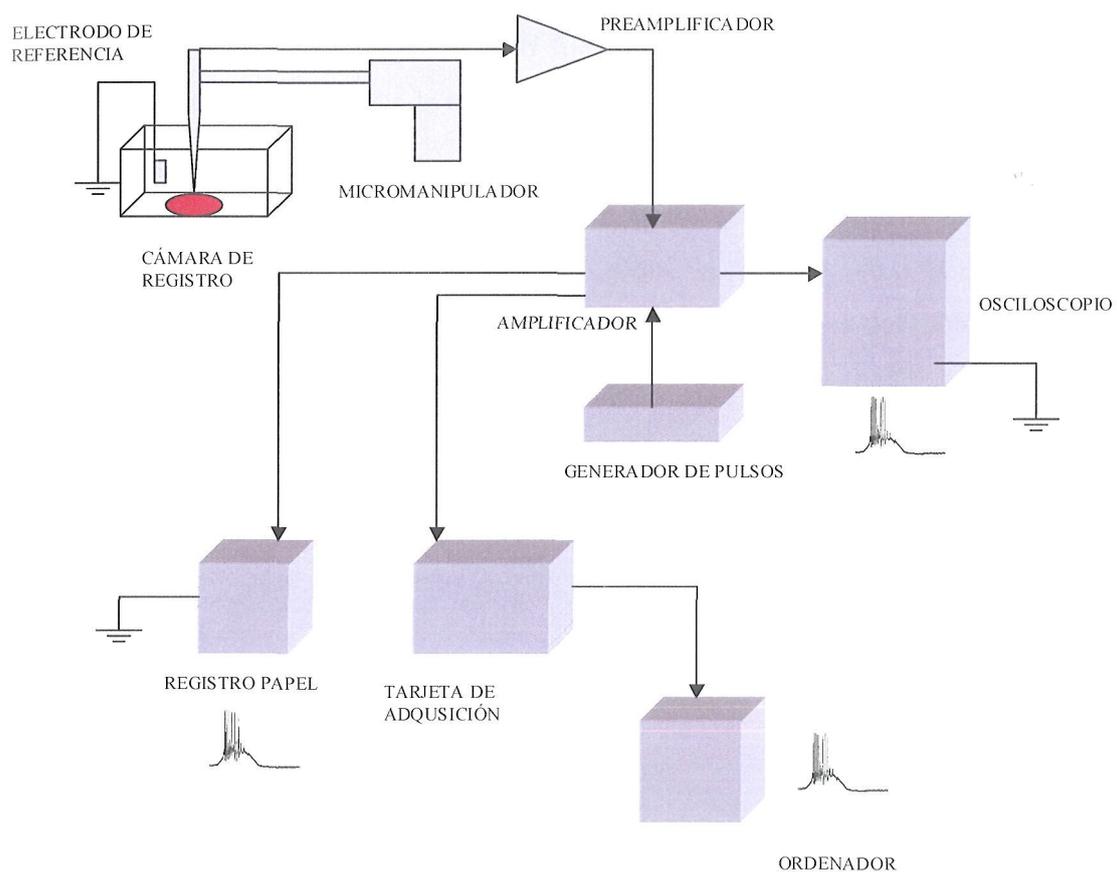
El método habitual para registrar el potencial del interior de la célula es la técnica de registro en modo puente también denominada cuando se usa la terminología anglosajona como *bridge*. La esencia de esta técnica reside en la conexión de la micropipeta a un amplificador de ganancia unidad que tiene una resistencia de entrada varios órdenes de magnitud mayor que la micropipeta y que la resistencia de entrada de la célula. Como se muestra en la figura 9, la salida del amplificador da el voltaje registrado en la punta del electrodo.



**Figura 9.** Representación esquemática del sistema de registro del voltaje

Hay varias maneras para establecer el balance del puente. Una técnica comúnmente usada consiste en aplicar pulsos de corriente breves repetitivamente al microelectrodo mientras esta sumergido en el baño de la preparación. El control del balanceo del puente se modifica hasta que la respuesta estacionaria al pulso de corriente se elimina. En este punto, el circuito está balanceado y la resistencia del microelectrodo puede leerse directamente del

control de balance del puente. Esta misma técnica se puede utilizar una vez penetrada la célula para rebalancear el puente. El amplificador está conectado a distintos sistemas de monitorización y almacenamiento tal y como se muestra en las figuras 10 y 11.



**Figura 10.** Representación del sistema de registro electrofisiológico

Además la unidad de registro dispone de un generador de pulsos, que facilita la aplicación de protocolos de pulsos de corriente para medir la resistencia de la membrana celular.

La inyección de corriente en la célula penetrada constituye un útil instrumento para valorar el estado global de la permeabilidad de su membrana. En esencia la técnica consiste en aplicar pulsos de corriente a través del microelectrodo y registrar las deflexiones de voltaje que desencadenan sobre el potencial de membrana. Es necesario rebalancear el puente, porque el electrodo puede haber sufrido cambios en su resistencia de entrada tras la penetración de la célula. Una vez compensado el puente de nuevo, se inyecta a través del electrodo pulsos de duración y amplitud fijas, y se registra el cambio en el voltaje de la célula cuando se alcanza el estado estacionario( Purves, R.D. 1981, Axon Guide, 1993)

Al objeto de proteger al sistema de perturbaciones eléctricas ambientales se apantalla con una jaula de Faraday que aloja la cámara con la preparación, los preamplificadores y la placa del peltier. Queda, no obstante, al descubierto la superficie anterior del sistema que también se protege mediante una lámina metálica móvil.



**Figura 11.** Fotografía del sistema de registro intracelular, donde se observa la mesa de disección de islotes (derecha), la jaula de Faraday (centro) y los sistemas de adquisición (izquierda).

## **2.6. SEÑALES DE CALCIO INTRACELULAR: MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.**

Las sondas fluorescentes absorben luz de una determinada longitud de onda y emiten luz de otra longitud de onda. Si un componente de este tipo es iluminado a su longitud de onda absorbente y visualizado a través de un filtro que sólo permita pasar la luz de longitud de onda igual a la de la luz emitida, el componente aparece brillante sobre fondo oscuro. La intensidad y el color de la luz emitida es una propiedad característica de la molécula fluorescente utilizada.

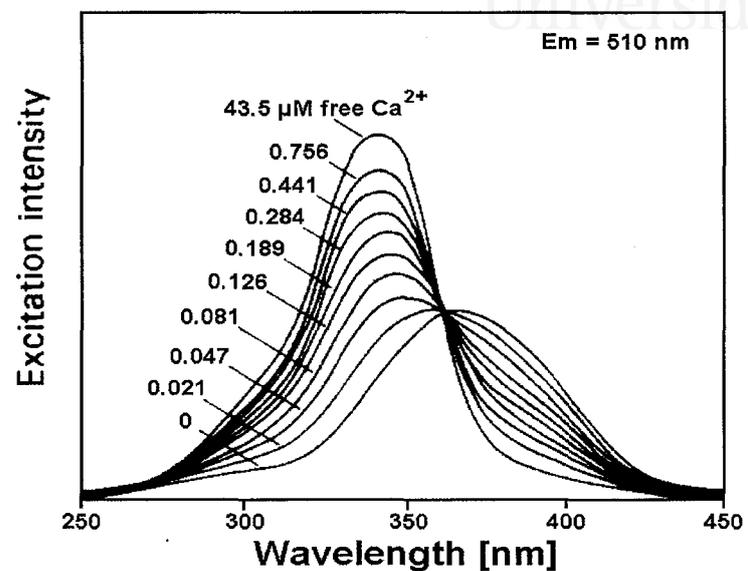
Las sondas fluorescentes son detectadas con la ayuda del microscopio de fluorescencia. Este microscopio es similar al microscopio convencional, a excepción de que la luz incidente que procede de una potente fuente atraviesa un primer filtro que selecciona la longitud de onda capaz de excitar al fluorocromo, antes de incidir sobre la muestra. La luz emitida por la muestra atraviesa un segundo filtro que selecciona la longitud de onda de emisión del fluorocromo.

Hay tres elementos básicos en un microscopio de fluorescencia:

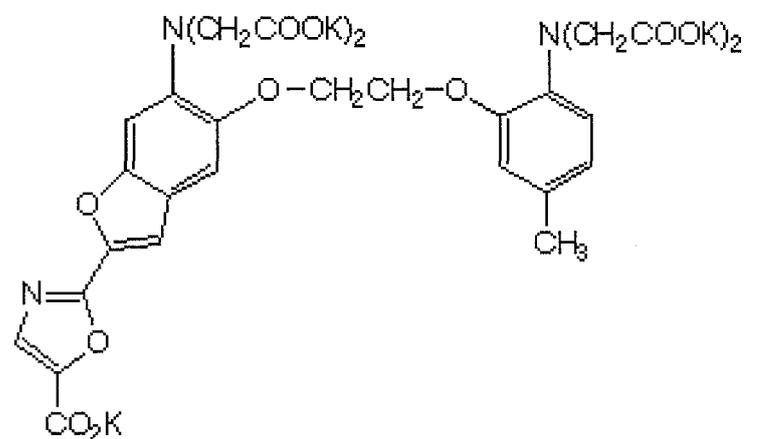
- Un primer filtro de corte o filtro de excitación. Es el filtro que selecciona la luz de la longitud de onda incidente.
- Espejo dicróico. Se trata de un espejo que tiene la propiedad de reflejar la luz de ciertas longitudes de onda y de dejar pasar otras.
- Un segundo filtro de corte o filtro de emisión. Es el filtro que selecciona la luz de longitud de onda fluorescente.

Para la monitorización del  $\text{Ca}^{2+}$ , se ha utilizado una sonda fluorescente, el Fura-2, cuyo espectro de excitación cambia en función de la concentración  $\text{Ca}^{2+}$  libre en el medio, de modo que el cambio que se observe en la fluorescencia puede ser calibrado en términos de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  (figura 12).

El Fura-2 es un derivado de EGTA (Grynkiewicz Poenie y Tsien, 1985) y contiene un sitio selectivo de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  (figura 13).



**Figura 12.** Espectro de excitación del Fura-2 en función de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre.



**Figura 13.** Estructura química del Fura-2.

La estructura estérica de los cuatro grupos carboxilatos, los dos grupos amino y los dos grupos éster en este sitio de unión, confieren a estos compuestos una selectividad de 10:1 en su unión con  $\text{Ca}^{2+}$  en relación con el  $\text{Mg}^{2+}$  (figura 13). Esta selectividad es necesaria puesto que la concentración de  $\text{Mg}^{2+}$  libre citosólico (1mM) es aproximadamente  $10^4$  veces mayor que la de  $\text{Ca}^{2+}$  (100nM).

Cuando el Fura-2 enlaza  $\text{Ca}^{2+}$  se produce un desplazamiento en su espectro de excitación. En ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  el fura-2 tiene un máximo en su espectro de excitación alrededor de 380 nm y en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  el máximo está en 340 nm, lo que da lugar a un aumento de la fluorescencia medida a 340 nm y una disminución en la fluorescencia a 380 nm, cuando se produce un aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .

El hecho de que la unión a  $\text{Ca}^{2+}$  altere, no sólo las amplitudes de los picos de excitación y emisión de estos compuestos, sino además sus longitudes de onda, permite calcular la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  a partir de la razón de las amplitudes del par de longitudes de onda de excitación. La razón de amplitudes permite en principio, eliminar el error introducido por variaciones en la concentración intracelular del indicador, en la intensidad total de iluminación, en la sensibilidad del sistema detector y por movimientos de la preparación.

La utilización de este indicador fluorescente representa un método óptico de medición de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  de respuesta mucho más rápida que con microelectrodos de  $\text{Ca}^{2+}$ , y que no requiere la medición simultánea del potencial de membrana, permitiendo además la detección de señales heterogéneas espacialmente, la medición de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en células muy pequeñas e incluso en procesos o regiones celulares.

Por otra parte, se necesitan concentraciones muy pequeñas de indicador disminuyendo así el efecto tampón sobre cambios transitorios de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , y permitiendo hacer mediciones en menor tiempo y menor volumen de tejido. Es más fácil de calibrar en

términos de concentraciones locales absolutas de  $\text{Ca}^{2+}$ , por su mayor selectividad  $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ , su constante de disociación para el  $\text{Ca}^{2+}$  cercana a los niveles fisiológicos de  $\text{Ca}^{2+}$  (224 nM para Fura-2) y la posibilidad de medir la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  a partir de la razón de amplitudes.

El Fura-2 es un compuesto policarboxilado y posee la ventaja de que puede ser cargado en el citoplasma en una gran variedad de células, sin punción, o tan siquiera disrupción temporal de la membrana plasmática. Este llenado es posible porque los compuestos carboxilados pueden enmascararse con grupos ésteres lábiles, como los acetoximetilos, dando derivados lipofílicos que cruzan la membrana plasmática pero son hidrolizados de nuevo a aniones policarboxilados por esterasas citosólicas. De esta forma pueden cargarse grandes poblaciones celulares con estos indicadores simplemente por incubación con el éster.

Existen trabajos indicando el problema de la compartimentalización del Fura-2 en organelas, por ejemplo en las mitocondrias, o la generación de productos de hidrólisis, altamente fluorescentes pero insensibles al calcio. La cantidad de estos productos depende mucho del tipo de célula que se estudie. Otro inconveniente es el fotoaclaramiento, aunque no debería ser un problema en sí mismo si se utiliza el método de la razón de fluorescencias; sin embargo una consecuencia del fotoaclaramiento es la generación de productos fluorescentes que muestran una sensibilidad diferente a  $\text{Ca}^{2+}$  comparada con el indicador libre.

Los islotes tras la extracción y una hora de incubación a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  con el medio de aislamiento, se cargaron con  $4\text{ }\mu\text{M}$  de la sonda de  $\text{Ca}^{2+}$  fluorescente, Fura-2 AM (Molecular Probes, Leiden, Holanda) a partir de un stock  $2\text{ mM}$  con DMSO (0.1 % en el medio de cargado) durante al menos 2 horas a temperatura ambiente, siempre gaseándose con una mezcla de 95%  $\text{O}_2$  y 5%  $\text{CO}_2$ . Tras el cargado, los islotes fueron depositados en una cámara

de perfusión en el microscopio sobre un cubre en contacto con el objetivo. Los islotes se quedaron fijos al sustrato mediante el revestimiento de éste con poli-L-lisina (0.01%).

El protocolo seguido para las células aisladas procedentes de los islotes es similar, con la única excepción de que se cargaron con 2  $\mu$ M de la sonda fluorescente, Fura-2 AM.

En los experimentos realizados tanto en el islote entero como en las células aisladas, se monitorizó la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  de células individuales mediante el seguimiento con un microscopio invertido de epifluorescencia Zeiss Axiovert 200 M con un objetivo de 40x. Las imágenes fueron adquiridas cada 3 segundos con una cámara digital C4742-95 (Hamamatsu Photonics, Barcelona) a través de una rueda de filtros (Sutter Instruments CO, CA, USA) equipada con los filtros 340 nm y 380 nm (Omega optics, Madrid) Las imágenes son procesadas mediante un programa informático, el AQUACOSMOS 2.0, distribuido por HAMAMATSU PHOTONICS K.K.

Los experimentos se realizaron mediante un sistema de válvulas y un termostato que controlaban respectivamente el paso de los diferentes medios perfundidos a los islotes (tasa de  $\approx 0.5$  ml/min) gaseados con 95%  $\text{O}_2$  y 5%  $\text{CO}_2$  y una temperatura fija de 37  $^{\circ}\text{C}$ .

## **2.7. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.**

Los experimentos realizados durante esta tesis están enfocados a obtener información sobre la comunicación intercelular de la célula  $\beta$  pancreática en el islote de Langerhans y su importancia en la aparición del patrón oscilatorio y en el fenómeno de memoria celular. Era necesario buscar un parámetro que nos permitiera distinguir el grado de comunicación establecido por las células en función del acoplamiento celular. Así, y de acuerdo con nuestra hipótesis, si las células permanecen acopladas se podrán observar poblaciones de espigas de diferente amplitud, mientras que si las células permanecen

desacopladas, desaparecerán determinadas poblaciones de espigas, procedentes de células vecinas y que se propagan a través de las gap junctions. El parámetro elegido fue la amplitud de espiga.

Los registros electrofisiológicos se adquirieron con el programa Axoscope v. 9.0 (Axon Instruments) a una frecuencia de 1 KHz.

Para realizar las medidas de amplitud se eligió una línea base que viene determinada por el nivel *plateau* del burst. Tales medidas se realizaron mediante el programa *Clampfit* v. 9.0 (Axon Instruments). El análisis de las espigas se realizaba dentro de la misma célula, comparando el patrón antes de la aplicación de los bloqueantes de las gap con el patrón obtenido después de la aplicación y manteniendo siempre la misma línea base.

En los experimentos relacionados con memoria celular, el parámetro utilizado fue el área comprendida entre una línea base (nivel de potencial en fase silente mínimo) y el nivel de potencial de la célula durante el tiempo en que se produce la aplicación de un pulso de glucosa (paso de 8 a 12 mM durante 1 min. , para volver nuevamente a 8 mM). La elección de este parámetro ( $\text{Área} = V_m \text{ (mV)} \times t \text{ (s)}$ ) se basó en la conveniencia de obtener una medida de los cambios de actividad que se producen como consecuencia de la acción muscarínica del carbacol, en los experimentos control, y de la acción del carbacol junto con concentraciones crecientes de bloqueantes. De esta forma podemos medir la fracción de tiempo que la célula está en fase activa, así como el nivel relativo de la variación de potencial de membrana, obteniendo una medida completa de la acción de los agentes muscarínicos sobre la actividad eléctrica de la célula  $\beta$  pancreática.

El cálculo de las áreas se realizó mediante el programa Sigmaplot v.8.0 (Jandel Scientific) y el uso de una tarjeta digital (Summagraphics) para realizar medidas

bidimensionales. Las áreas obtenidas para cada célula antes y después de la aplicación del pulso de carbacol (control) y del pulso de carbacol junto con bloqueantes (tratado) fueron normalizadas, es decir, en cada experimento el valor de normalización se obtiene considerando la media de los pulsos control (antes de la aplicación del carbacol) como 1, y dividiendo las áreas correspondientes al período postestimulación por este valor medio. La normalización de las áreas nos permite hacer comparaciones entre los valores obtenidos antes y después de la estimulación con carbacol.

Por último, para estudiar cómo influye el número de células acopladas en la aparición del patrón oscilatorio en los experimentos de medidas de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, el parámetro utilizado fue la ratio de fluorescencia a 340nm y 380nm ( $F_{340}/F_{380}$ ). Las imágenes eran adquiridas cada 3 segundos con una cámara digital C4742-95 (Hamamatsu Photonics, Barcelona, Spain).



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

### **3. RESULTADOS**

### 3.1. ACOPLAMIENTO CELULAR Y APARICIÓN DEL PATRÓN OSCILATORIO EN LA CÉLULA $\beta$ PANCREÁTICA.

Hay evidencias que apoyan la idea de que las gap junctions juegan un papel importante en el acoplamiento eléctrico y metabólico del islote. No obstante, dicho acoplamiento intercelular parece estar restringido a pequeños grupos celulares y no se excluyen otros mecanismos que sirvan para sincronizar la respuesta del islote.

Las *gap junctions* permiten la propagación de señales de una célula a otra. Se ha observado que en células aisladas las oscilaciones de  $[Ca^{2+}]_i$  suelen ser lentas e irregulares y probablemente reflejando la irregularidad y heterogeneidad de la actividad eléctrica en la célula  $\beta$  aislada. Hay modelos teóricos que predicen que las oscilaciones regulares del potencial de membrana emergen cuando las células están asociadas en clusters de tamaño suficiente. Se ha propuesto que el acoplamiento entre un número pequeño de células parece ser suficiente para observar patrones oscilatorios homogéneos (Jonkers *et al.*, 1999).

Por todo ello, se planteó el estudio de la aparición de dicho patrón oscilatorio en función del acoplamiento celular existente en el islote. Se utilizaron concentraciones crecientes de bloquantes de las gap junctions (heptanol, octanol, glicirretínico, halotano), midiendo la actividad eléctrica mediante registro electrofisiológico como se ha explicado con detalle en Material y Métodos. Posteriormente, se realizaron estudios paralelos para confirmar si el número de células agrupadas dentro de un cluster era determinante en cuanto a la aparición del patrón oscilatorio. Se registraron grupos celulares de distinto tamaño mediante el uso de la sonda fluorescente Fura-2, midiendo las oscilaciones de calcio intracelular.

### 3.1.1. Diseño de los protocolos experimentales.

Para el estudio de la aparición de la actividad eléctrica del islote y su posible variación en función del grado de acoplamiento celular se diseñó un protocolo que permitiera observar los cambios que se producían en dicha actividad en función de las concentraciones de bloqueante utilizadas. Se eligió una base de 9 mM de glucosa, que se mantuvo durante todo el experimento, para asegurar la aparición del patrón oscilatorio en todas las células testadas. Sobre esta concentración base de glucosa, se añadieron concentraciones crecientes de bloqueante (figura 14). Cada concentración se aplicó durante 10-15 min. Se eligió este periodo de aplicación por el simple hecho de obtener una ventana temporal en donde la actividad eléctrica alcance un estado estacionario para cada concentración de bloqueante y no se observaran cambios en dicho patrón.

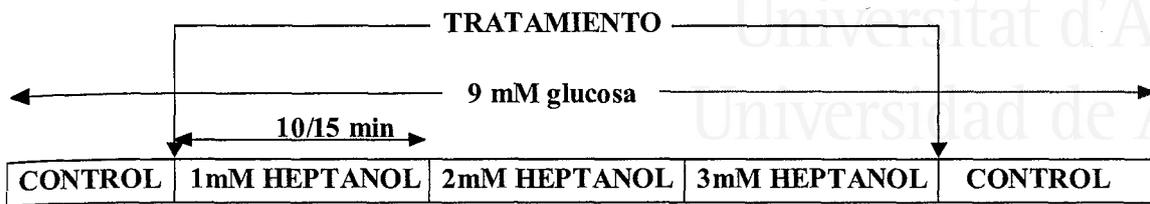
Numerosos experimentos encaminados a estudiar en papel del acoplamiento celular en diversos sistemas han utilizado agentes desacoplantes clásicos, como pueden ser el halotano, octanol, heptanol y más recientemente el ácido glicirretínico (AGA). Sin embargo se ha demostrado que algunos de ellos, a parte de actuar o ser poco específicos sobre las uniones *gap* poseen efectos secundarios sobre la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular o sobre el pH citosólico.

Las razones por las cuales se optó por la elección de 1-heptanol son diversas. Previamente se testaron el resto de bloqueantes nombrados. El halotano es una sustancia tremendamente volátil y sensible a la luz, por lo que su manejo se hacía muy complicado dado que cada 5 min debíamos de preparar nuevas soluciones para evitar que se volatilizara. Aún así, los resultados obtenidos con dicho bloqueante no eran satisfactorios, puesto que en la mayoría de los casos al aplicarlo sobre la célula beta pancreática no se observaba ningún cambio en su patrón eléctrico, posiblemente debido a los problemas mencionados anteriormente. Además, el halotano inhibe la producción de  $\text{IP}_3$  (Deutsch *et al.*, 1995), afectando a la maquinaria celular.

El ácido 18  $\alpha$ -glicirretínico, además de afectar a la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Squires *et al.*, 2000) no es soluble en el medio de perfusión, sino en DMSO. Existían problemas de solubilidad cuando se añadía la cantidad de bloqueante necesario, puesto que inmediatamente el ácido 18  $\alpha$ -glicirretínico precipitaba en el fondo del vaso, con lo que sus efectos eran nulos.

Tanto el octanol como el heptanol producían el mismo efecto sobre la actividad eléctrica, pero se necesitaban concentraciones menores del 1-heptanol para observar el mismo efecto visto con el uso de 2-octanol. Es por todo esto que se optó por utilizar esta última sustancia para la realización de todos nuestros experimentos. Dicho bloqueante ha sido ampliamente usado en numerosos estudios de inhibición del acoplamiento y en distintos sistemas, como las células acinares del páncreas exocrino (Meda *et al.*, 1986), células de Purkinje (Takens-Kwak *et al.*, 1992), células del corazón (Bastide *et al.*, 1995) e incluso en la célula beta pancreática, objeto de estudio de esta tesis (Perez-Armendariz *et al.*, 1991)

Una vez aplicado el 1-heptanol, se retiraba del medio y se observaba la aparición del patrón oscilatorio. Aunque el efecto que causaba el 1-heptanol era el mismo en todos los experimentos realizados, los datos siempre se refieren a la misma célula, es decir, una misma célula sirve de control y tratamiento, intentando minimizar la heterogeneidad existente en los patrones oscilatorios entre distintas células.



**Figura 14.** Diseño del protocolo experimental utilizado. Sobre una base de 9 mM glucosa se aplican concentraciones crecientes del bloqueante, en este caso, 1-heptanol.

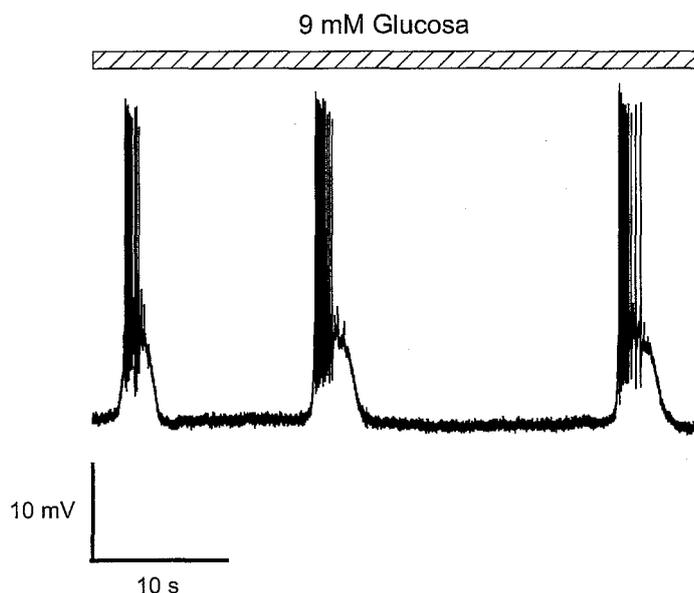
Por otro lado, para observar si el 1-heptanol tenía efectos sobre las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular se aplicó el mismo protocolo descrito anteriormente sobre el islote entero cargado con la sonda fluorescente Fura-2, y midiendo la fluorescencia a 340 nm y 380 nm. Las imágenes eran adquiridas cada 3 segundos con una cámara digital C4742-95 (Hamamatsu Photonics, Barcelona, Spain).

Por último, para el estudio de la variabilidad de las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en función de las células  $\beta$  acopladas se realizó una disgregación mecánica del islote de Langerhans para conseguir grupos celulares de distinto tamaño. Sobre estos grupos se incubó la sonda fluorescente y se midieron las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre una base de 11 mM de glucosa.

### **3.2. RESPUESTA ELÉCTRICA A LA ACCIÓN DE LOS BLOQUEANTES DE LAS GAP JUNCTIONS.**

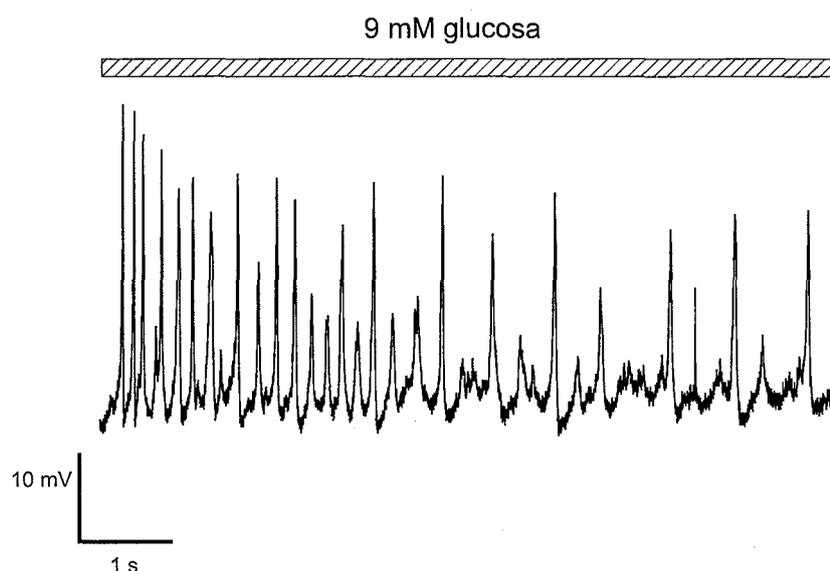
#### **3.2.1. Patrón eléctrico en presencia de 9 mM glucosa.**

Según el protocolo experimental explicado en el apartado anterior, se utilizó como control las oscilaciones en el potencial de membrana previas a la aplicación del 1-heptanol. Se puede ver claramente la alternancia de las fases activas con las fases silentes, y la superposición de las espigas de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre las fases activas (figura 15). Esta alternancia de fases del potencial de membrana se mostraba a una frecuencia de 2-4 oscilaciones por minuto. La frecuencia es variable entre islotes, debido a la heterogeneidad de la respuesta a glucosa de cada célula  $\beta$  pancreática.



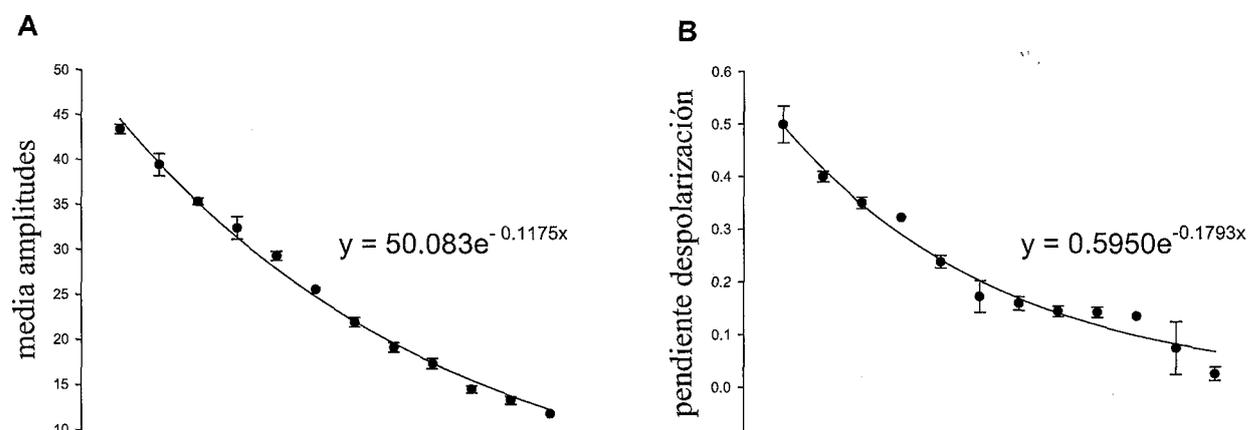
**Figura 15.** Oscilaciones del potencial de membrana de la célula  $\beta$  pancreática en respuesta a una concentración estimuladora de glucosa. Se puede observar la alternancia de las fases activas con las fases silentes.

Si se observa con más detenimiento los potenciales de acción de  $\text{Ca}^{2+}$  que se superponen sobre las fases activas de cada *burst* se muestra como dichas espigas presentan un patrón de distribución heterogéneo en función de la amplitud de espiga (figura 16)



**Figura 16.** Espigas de  $\text{Ca}^{2+}$  superpuestas en un *burst* control. Se pueden observar distintas poblaciones en función de la amplitud de espiga, observándose espigas de mayor amplitud, probablemente pertenecientes a la célula que se está registrando, y espigas de menor amplitud, posiblemente generadas en células vecinas y propagadas a través de las gap junctions.

La amplitud de cada espiga está relacionada con la velocidad a la que se produce cada potencial de acción de  $\text{Ca}^{2+}$ . Las espigas que poseen mayores amplitudes son las espigas más rápidas. Por el contrario, aquellas espigas de menor amplitud suelen ser más lentas en comparación con las anteriores, y muestran una morfología más acampanada. Al ordenar las espigas en función de su amplitud o de la pendiente de despolarización se puede observar una caída exponencial debido a la posibilidad de que los potenciales de acción más pequeños y lentos se hayan propagado a través de filtros RC que suponen varias uniones gap (figura 17).

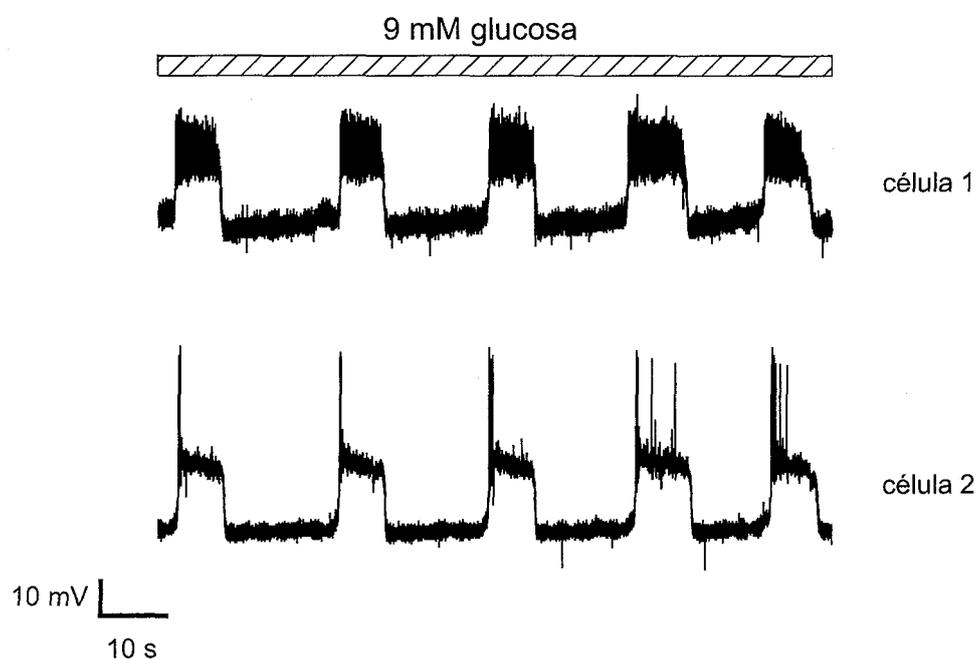


**Figura 17.** Distribución poblacional de espigas. **A.** Las amplitudes muestran una caída exponencial ( $r = 0.998$ ) debido a la propagación de las espigas a través de filtros RC.

**B.** Sucede lo mismo con las pendientes de despolarización de cada espiga ( $r = 0.989$ ), obteniendo valores más elevados en aquellas espigas más rápidas.

Mediante la técnica del registro doble intracelular se pretende demostrar que las células registradas oscilan de manera sincrona, hecho que indica el establecimiento de una comunicación eléctrica a través de las *gap junctions*.

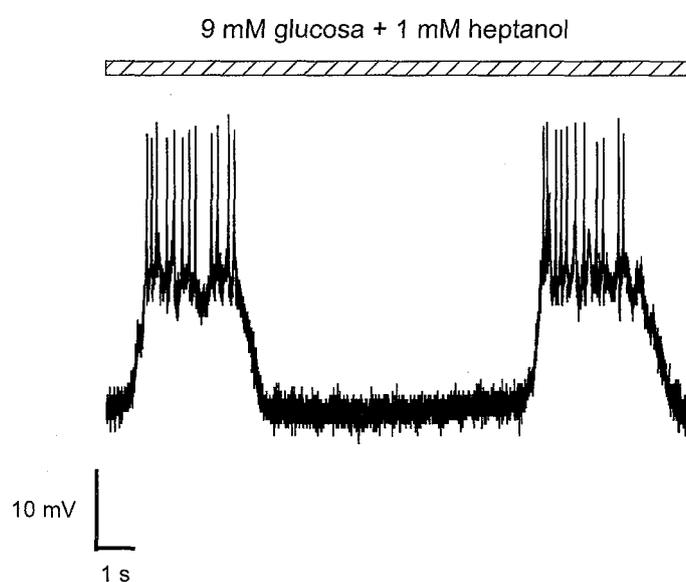
El posicionamiento de los dos electrodos es fundamental, puesto que se necesita que estén lo suficientemente cerca el uno del otro como para asegurarnos que ambas células se encuentran acopladas eléctricamente. Esta técnica nos permite observar efectivamente que en condiciones normales el islote se comporta como un *sincitio*, donde las células registradas ( $n = 10$ ) presentan las oscilaciones del potencial de membrana y una actividad totalmente sincrona (figura 18).



**Figura 18.** Actividad oscilatoria sincrona en dos células registradas mediante el registro doble intracelular.

### 3.2.2. Patrón eléctrico en presencia de 9 mM glucosa y 1 mM heptanol.

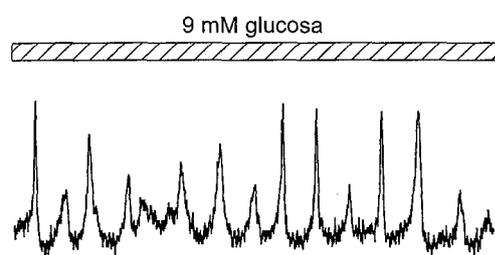
Cuando sobre la base de 9 mM glucosa se aplicaba una concentración de 1 mM de 1-heptanol, bloqueante de las uniones gap, se puede observar que la actividad oscilatoria sigue apareciendo en el 90 % de las células registradas ( $n=33$ ), con la correspondiente alternancia entre las fases activas y fases silentes y la superposición de las espigas de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre las fases activas (figura 19). El efecto del heptanol a estas concentraciones aparecía alrededor de  $1.33 \pm 0.47$  min.



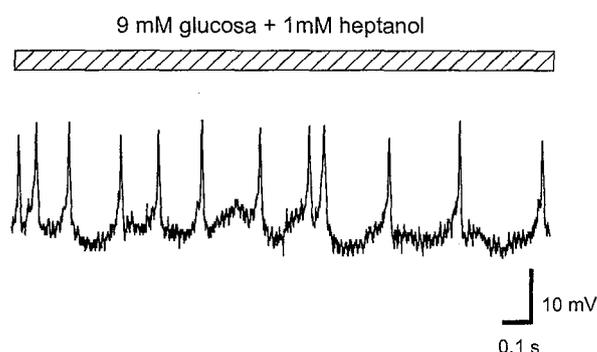
**Figura 19.** Efecto de 1mM 1-heptanol sobre la actividad oscilatoria. A estas concentraciones de bloqueante se mantiene la actividad oscilatoria, con la homogeneización de las amplitudes de espiga.

Esta concentración de bloqueante no es suficiente como para impedir la aparición de la actividad oscilatoria. No obstante, hay un hecho significativo que diferencia este patrón del patrón control, mostrado en la figura 16. la heterogeneidad observada en situación control desaparece, y sólo se registran las espigas de mayor amplitud (figura 20). Este hecho estaría en concordancia con el bloqueo de las uniones intercelulares por el heptanol, impidiendo la propagación de las espigas más lentas, generadas en lugares más distantes de la célula que se está registrando.

#### A. Control

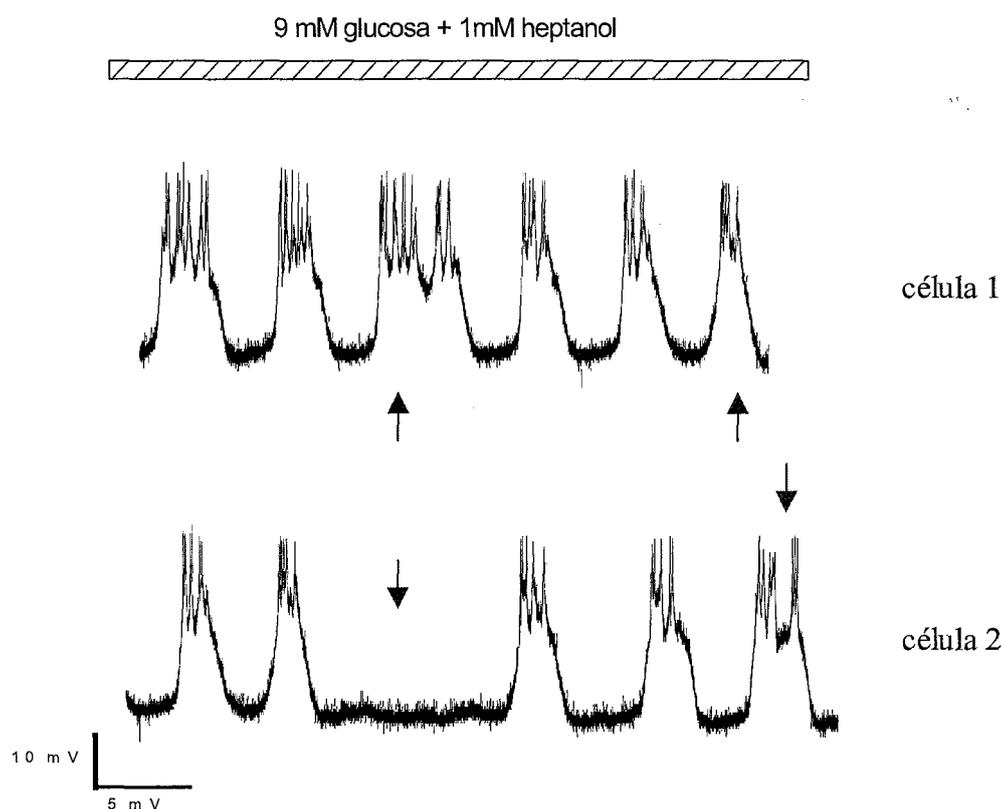


#### B. Tratamiento: 1 mM heptanol



**Figura 20.** Homogeneización de las espigas de  $\text{Ca}^{2+}$  debido a la acción de 1 mM heptanol. **A.** Control. Se puede observar la heterogeneidad poblacional de espigas. **B.** Tratamiento con 1 mM heptanol. En este caso desaparecen las espigas de menor amplitud.

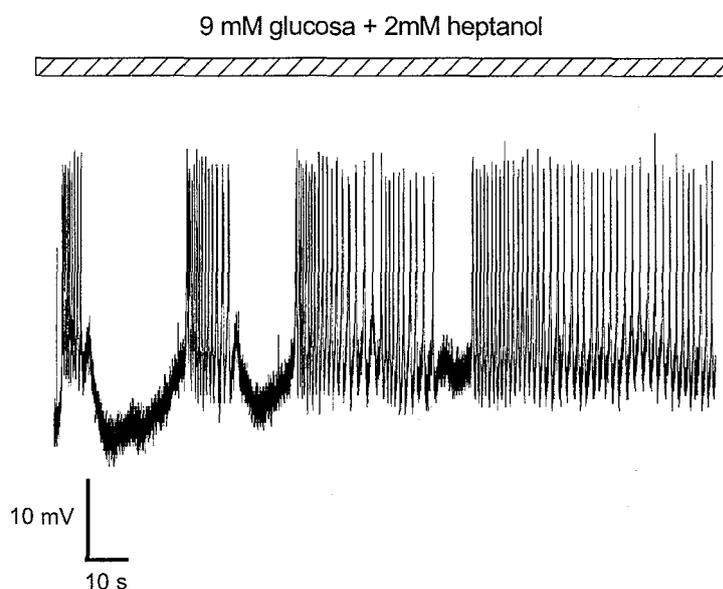
Si se realiza un registro doble de células  $\beta$  pancreáticas en presencia de 1 mM heptanol cabría esperar que el patrón oscilatorio se mantuviera pero ambas células presentarían una determinada asincronía una con respecto de la otra debido al cierre de las comunicaciones. El grupo celular ya no se comportaría como un *sincitio*, sino que debido a que las gap se están cerrando cada célula empezaría a oscilar de forma independiente. Un ejemplo de este fenómeno se puede observar en la figura 21, donde las células registradas presentan dicha asincronía en presencia de 1 mM heptanol.



**Figura 21.** Registro doble simultáneo de dos células  $\beta$  pancreáticas en presencia del bloqueante 1mM heptanol. Se puede observar que ambas células son asíncronas (flechas)

### 3.2.3. Patrón eléctrico en presencia de 9 mM glucosa y 2 mM heptanol.

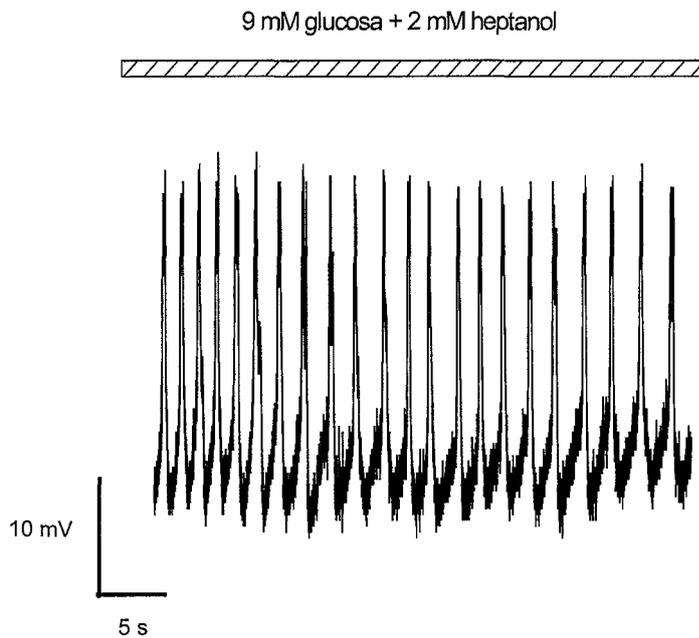
Cuando se aplicaban concentraciones superiores de heptanol, en todas las células registradas ( $n = 33$ ) se observaba la desaparición del patrón característico oscilatorio de la célula  $\beta$  pancreática en un tiempo estimado de  $0.74 \pm 0.18$  min. A concentraciones de 2 mM de heptanol las células mostraban un patrón irregular, donde ya no se alternan las típicas fases activas con las fases silentes. La célula no es capaz de repolarizar hasta el potencial de reposo y muestra un espigeo continuo. (figura 22).



**Figura 22.** Registro intracelular en presencia de 2 mM heptanol. La célula es incapaz de generar el patrón oscilatorio característico, mostrando una actividad irregular.

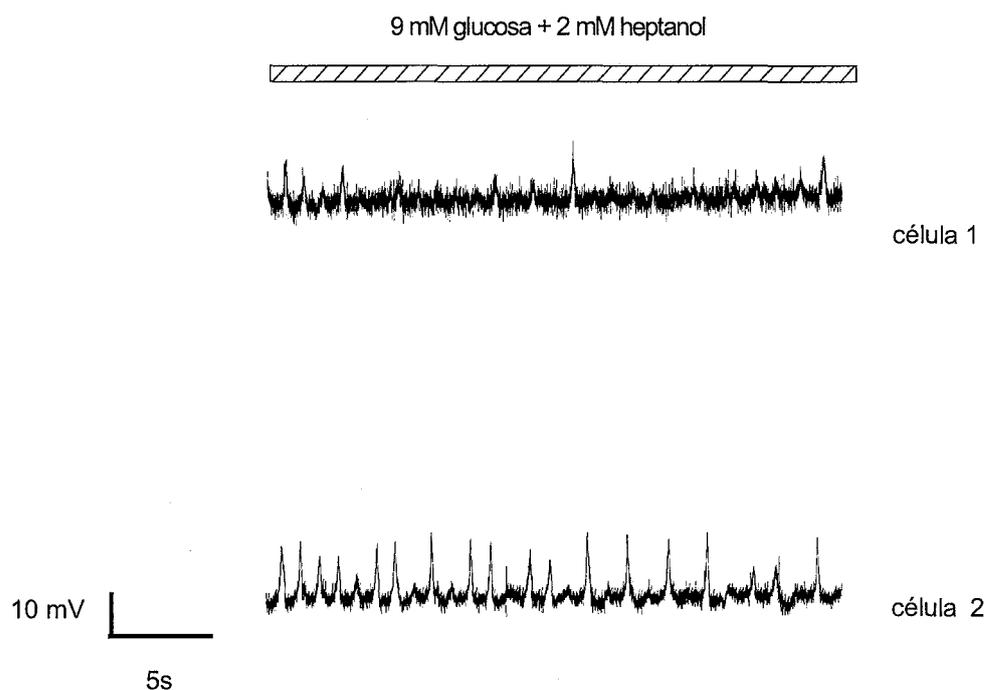
Si observamos con detenimiento la actividad eléctrica en fase estacionaria cuando se aplican concentraciones de 2 mM heptanol, se puede observar que la célula se mantiene en

el potencial meseta, sin llegar a repolarizar hasta el potencial de base, manteniendo un espigeo continuo e irregular, propio del comportamiento de células aisladas (figura 23).



**Figura 23.** Actividad eléctrica en presencia de 2 mM heptanol. La célula no es capaz de generar el patrón oscilatorio característico y muestra una actividad propia de una célula  $\beta$  aislada.

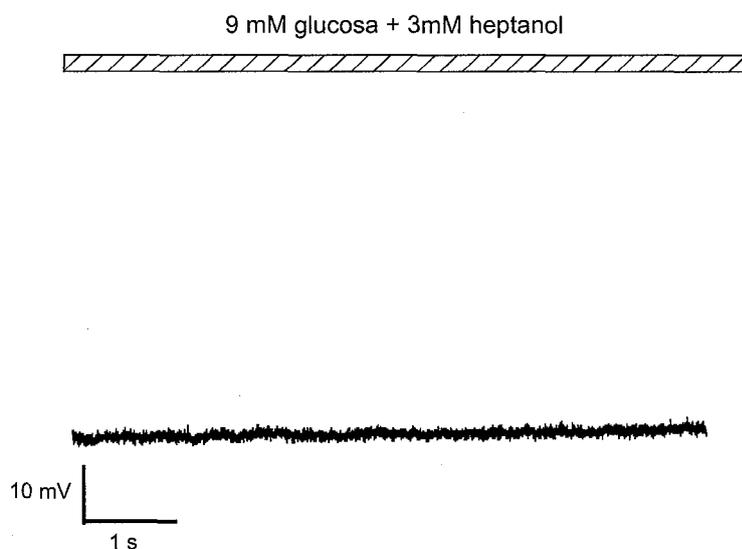
Al realizar el registro doble de dos células  $\beta$  pancreáticas se puede observar como cada célula se comporta de manera independiente en presencia de estas concentraciones de heptanol (figura 24). Este hecho es significativo, ya que nos está indicando que las uniones gap se encuentran bloqueadas de tal manera que las células que se están registrando de forma simultánea se comportan como células aisladas.



**Figura 24.** Registro doble simultáneo de dos células  $\beta$  pancreáticas en presencia de 2mM heptanol. Se puede observar que cada una de ellas se comporta de forma independiente. Mientras que la célula 1 muestra escasas espigas, en la célula 2 se observan mayor cantidad de éstas. Ambas se mantienen en un potencial meseta, sin llegar a repolarizar y no son capaces de generar el patrón oscilatorio.

### 3.2.4. Patrón eléctrico en presencia de 9 mM glucosa y 3 mM heptanol.

Finalmente, para concentraciones de 3 mM heptanol o superiores todas las células registradas ( $n = 33$ ) se mantenían en estado hiperpolarizado y silente, sin capacidad para generar el patrón oscilatorio característico. Esta situación coincide con uno de los posibles estados que puede presentarse cuando una célula se encuentra totalmente aislada (figura 25).



**Figura 25.** Registro intracelular de una célula  $\beta$  pancreática en presencia de 3 mM heptanol. En todos los casos la célula permanece silente e hiperpolarizada.

### 3.2.5. Reversibilidad del proceso.

Tras la eliminación del medio de perfusión de los bloqueantes de las *gap junctions* todas las células registradas ( $n = 33$ ) volvían a mostrar el patrón oscilatorio característico de alternancia de fases activas con fases silentes y la superposición de las espigas de  $\text{Ca}^{2+}$  de distinta amplitud, indicando la restauración de la comunicación intercelular. Aunque en cada experimento se registraba un tiempo de recuperación diferente, debido a la sensibilidad de cada célula a la acción de los bloqueantes, en este caso el heptanol, las células volvían a recuperar el patrón oscilatorio en torno a los  $2.82 \pm 0.92$  min. Aunque no se descartan posibles efectos secundarios del heptanol, y sobretodo, a elevadas concentraciones, un hecho indicativo es que el proceso es reversible y que por lo tanto la aplicación del heptanol no afecta a la viabilidad y supervivencia del islote.

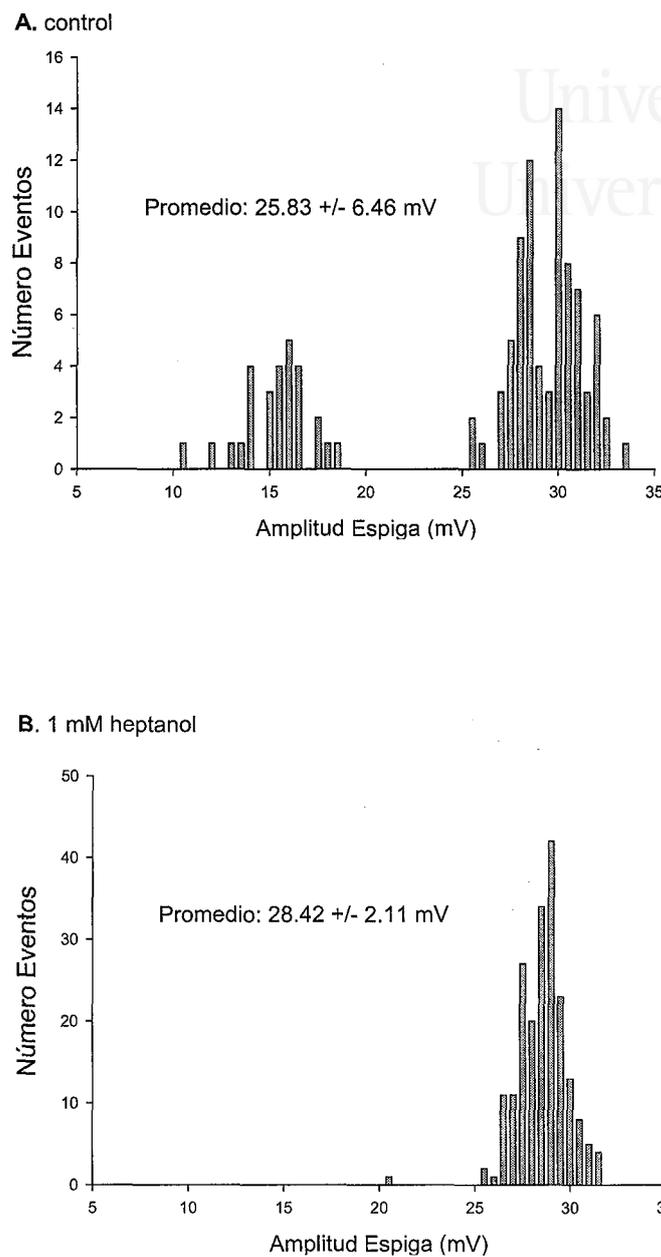
### 3.2.6. Distribuciones de frecuencias.

Los análisis numéricos de amplitud de espiga se realizaron de acuerdo con el protocolo explicado en el apartado de Material y Métodos. Para ello, de todas las células registradas ( $n = 33$ ) se eligieron aquéllas que mantenían el potencial de membrana estable durante toda la duración del experimento, evitando así posibles anomalías debidas a la variación del potencial. Sobre estas células ( $n = 11$ ) se analizaron las amplitudes de espiga de los *bursts* previos a la aplicación de bloqueantes y las amplitudes de espiga durante el tratamiento con heptanol, de tal forma que la misma célula servía de control y tratamiento a la vez.

Los resultados obtenidos tras los análisis muestran una distribución bimodal en presencia de 9 mM glucosa, observándose un grupo poblacional de menor amplitud, y otro grupo poblacional centrado en la zona de mayor amplitud de espiga. El hecho de la aparición de distintos grupos poblacionales da una idea del estado activo de las

comunicaciones intercelulares, sugiriendo que tal vez las poblaciones de espigas de menor amplitud han sido generadas en las células vecinas y se han propagado a través de las *gap junctions*

Por el contrario, en presencia de bloqueantes de las uniones *gap*, las poblaciones centradas en la zona de menor amplitud de espiga tienden a desaparecer en todos los casos, quedando sólo aquellas poblaciones con mayor amplitud de espiga. Se podría pensar que el heptanol está bloqueando las comunicaciones intercelulares e impidiendo la propagación de las espigas generadas en células vecinas que estaban acopladas eléctricamente (figura 26).



**Figura 26.** Efecto del heptanol sobre la frecuencia de distribución de las espigas. **A.** Distribución bimodal de espigas en la situación control. **B.** el heptanol impide que se propaguen las espigas generadas en células vecinas, de menor amplitud, apareciendo sólo aquéllas correspondientes a la propia célula que se está registrando.

Las diferencias de amplitud entre los controles y el tratamiento resultaron estadísticamente significativas en el 63.63% de los casos, aumentando la media de las amplitudes de espiga durante la aplicación del heptanol y disminuyendo la desviación típica, indicando la homogeneización de amplitudes debido al cierre de las comunicaciones celulares y la sola aparición de las espigas de la propia célula registrada (tabla 3).

EXPERIMENTO	CONTROL: 9 mM glucosa AMPLITUD (mV) $\mu \pm SD$	TRATAMIENTO: 9 mM glucosa + 1 mM heptanol AMPLITUD (mV) $\mu \pm SD$
05412000	26.03 $\pm$ 12.87	30.46 $\pm$ 2.45
05414000	25.83 $\pm$ 6.46	28.42 $\pm$ 2.11
05425000	16.77 $\pm$ 5.15	24.06 $\pm$ 2.04
05426000	21.95 $\pm$ 7.38	26.51 $\pm$ 3.64
05429001	13.88 $\pm$ 3.91	21.23 $\pm$ 2.33
05510001	8.65 $\pm$ 3.86	12.20 $\pm$ 2.82
05513000	20.85 $\pm$ 8.03	25.44 $\pm$ 4.53
05512000	15.29 $\pm$ 7.37	16.26 $\pm$ 2.98
05704000	17.26 $\pm$ 5.56	16.73 $\pm$ 4.32
05503001	22.29 $\pm$ 8.10	20.12 $\pm$ 4.68
05426005	43.71 $\pm$ 19.24	46.42 $\pm$ 7.35

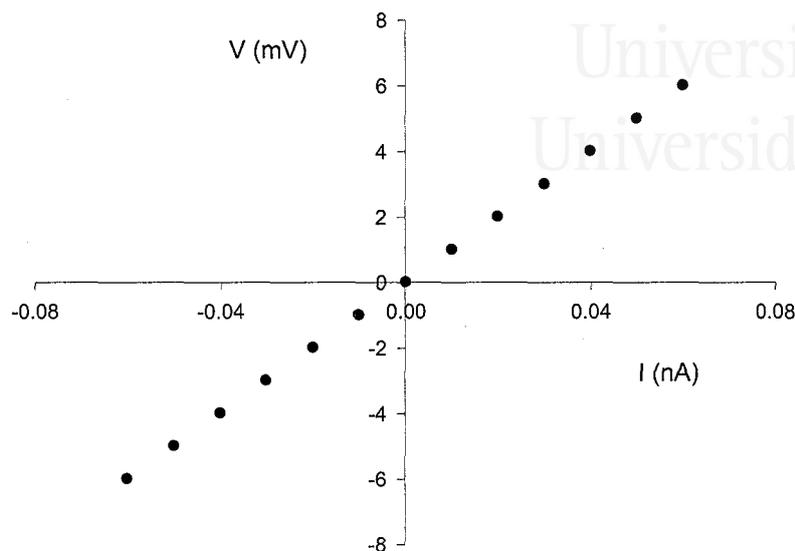
**Tabla 3.** Comparación de las amplitudes de las espigas en situación control y tratamiento. Se observa una clara homogeneización de las espigas durante el tratamiento con 1mM heptanol, aumentando la amplitud media y disminuyendo la desviación típica.

### 3.2.7. Resistencia de entrada de la célula.

Un indicador valioso a tener en cuenta es el valor de resistencia de entrada celular ( $R_I$ ). La resistencia de la célula registrada depende de la cantidad de células vecinas que la rodean: a mayor número de células, es menor la resistencia. La razón de este hecho es que la corriente inyectada se distribuye entre un mayor número de células debido a que éstas se encuentran conectadas entre sí a través de las comunicaciones intercelulares, formando un *sincitio*. Por lo tanto, el tamaño del grupo celular determinará el valor de la resistencia; a menor tamaño, mayor resistencia.

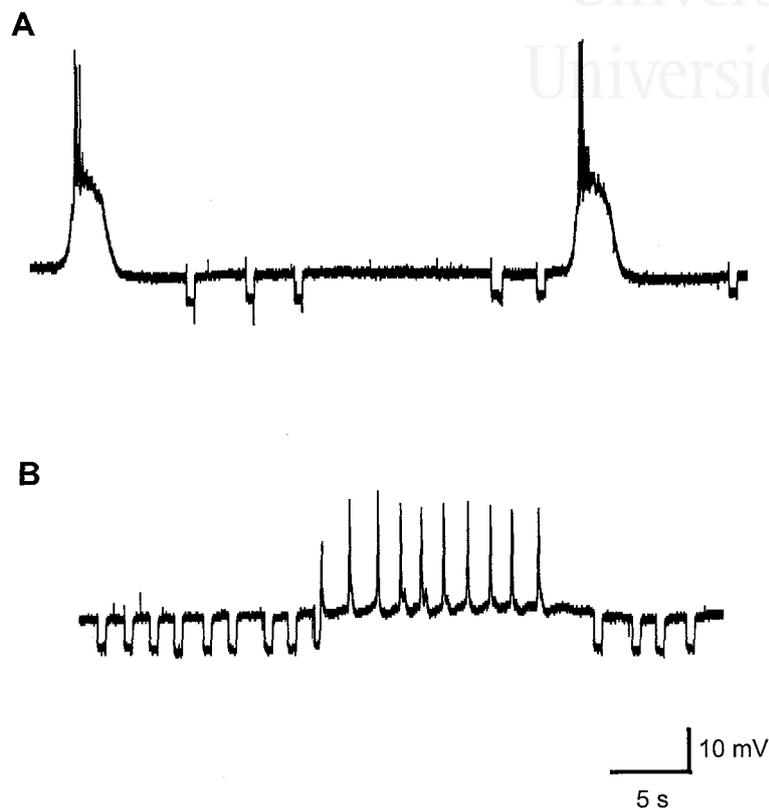
En condiciones control, cabe esperar valores de resistencia menores que tras la aplicación del bloqueante, debido a que las células mantienen la comunicación eléctrica con las células vecinas. Sin embargo, el heptanol, al bloquear dicha comunicación provocará que la célula registrada se comporte como célula aislada y que por lo tanto se obtengan valores de resistencia mayores.

Se utilizó un protocolo en el que se aplicaron pulsos de intensidad creciente del orden de nA en la célula, tanto en la situación control como en el tratamiento con heptanol, a través del microelectrodo de registro y se midieron las deflexiones de voltaje en mV que se producían en la membrana celular. Los datos obtenidos se representaron en una curva intensidad /voltaje (I/V), donde la pendiente, dentro del rango de linealidad, refleja el valor de resistencia de entrada de la célula, según la ley de Ohm ( $R = I \cdot V$ ) (figura 27).



**Figura 27.** Diseño experimental utilizado para medir la resistencia de entrada celular. La pendiente de la recta refleja el valor de  $R_I$  celular, según la ley de Ohm ( $V = I \cdot R$ ).

Tras la utilización del protocolo experimental se puede observar como al aplicar una concentración de 1 mM heptanol el valor de  $R_I$  aumentaba un 38%. Si se aumentaba la concentración del bloqueante a 2mM heptanol el valor de  $R_I$  se elevaba hasta un 30.5%, mientras que si la concentración de bloqueante era de 3 mM se obtenían aumentos de 24.84% (figura 28). Cabría esperar que al utilizar las mayores concentraciones de heptanol se obtuvieran los mayores aumentos en la resistencia de entrada, sin embargo, parece ser que esto no es así debido a que altas concentraciones se está afectando a la fluidez de la membrana, con lo que podría explicarse dicho fenómeno.



**Figura 28.** Deflexiones en el potencial de membrana debidas a la aplicación de pulsos de corriente aplicados para determinar la resistencia de entrada celular. **A.** Pulsos aplicados en la situación control, con 9 mM glucosa. **B.** Pulsos aplicados tras el tratamiento con heptanol, en este ejemplo se utiliza 2 mM heptanol. Las deflexiones en la membrana son mayores que en la situación control, traduciéndose en un aumento en la resistencia de entrada.

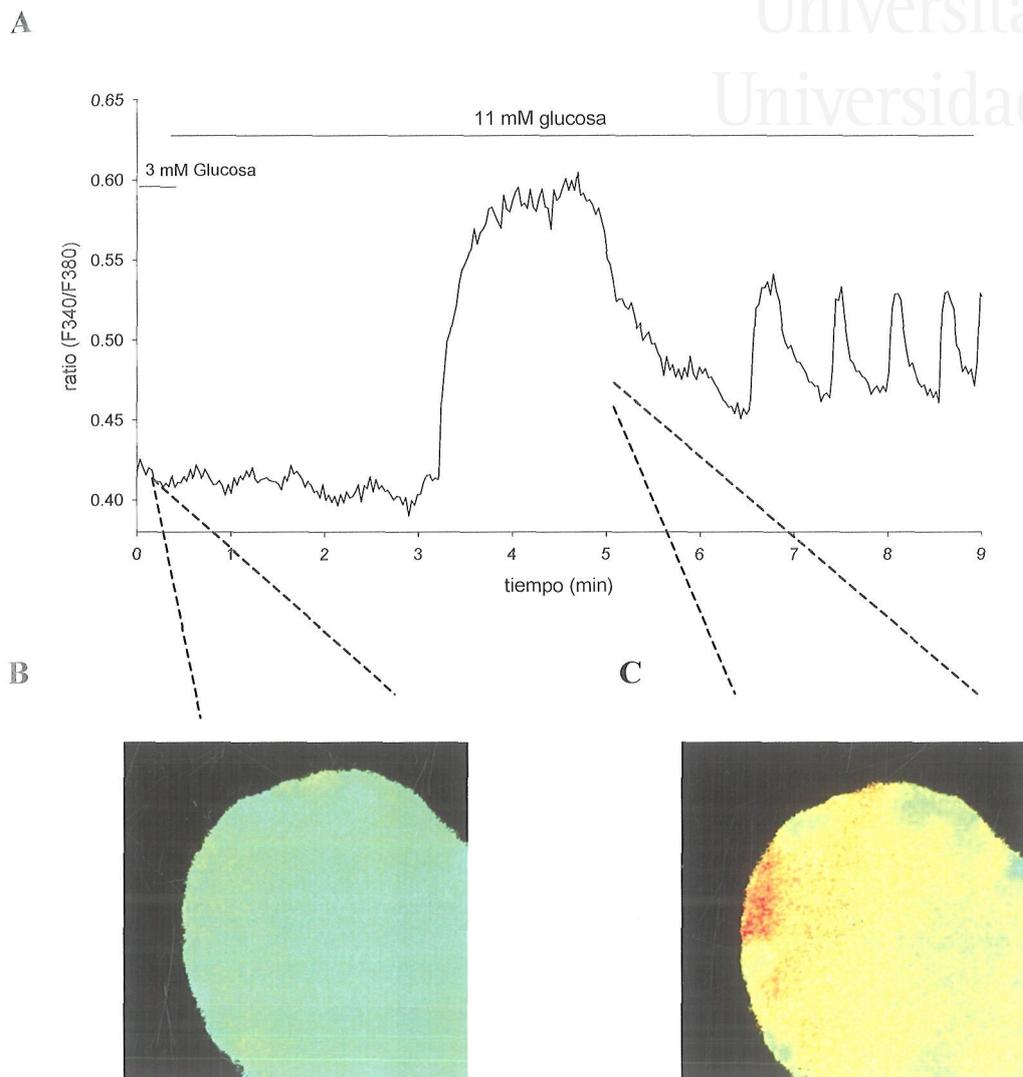
### **3.3. REGISTRO DE LAS OSCILACIONES DE CALCIO INTRACELULAR MEDIANTE SONDAS FLUORESCENTES.**

Como se ha mencionado anteriormente, a concentraciones estimuladoras de glucosa el islote muestra un patrón oscilatorio de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, como consecuencia de la actividad eléctrica, también oscilatoria. En estas condiciones, las oscilaciones del potencial de membrana se superponen con las oscilaciones del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular de manera que a medida que aumenta la concentración de glucosa aumenta la duración de las fases activas y disminuye la de las fases silentes en ambos patrones.

Los islotes fueron cargados con la sonda fluorescente sensible a  $\text{Ca}^{2+}$ , Fura-2 AM. Cabe resaltar que la sonda presenta problemas de penetración al interior del islote de manera que queda relegada espacialmente a la periferia del mismo. Este problema de difusión de la sonda se presenta comúnmente cuando se trabaja con preparaciones de cierto espesor. En este caso, dicho problema no constituye un factor negativo, ya que justamente es en la periferia donde se encuentran representados todos los tipos celulares.

La aplicación de glucosa a concentraciones estimuladoras ( $> 7$  mM) sobre el islote intacto producía la respuesta característica y ampliamente descrita para la célula  $\beta$ . Ésta permanece silente en términos de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en condiciones de 3 mM glucosa, mientras que a 11 mM se inicia un patrón oscilatorio con una frecuencia de  $1.93 \pm 0.06 \text{ min}^{-1}$ . A veces las oscilaciones vienen precedidas por una elevación transitoria de la  $[\text{Ca}^{+2}]_i$ .

Cuando se pasa de una concentración 3 mM glucosa a una concentración 11 mM glucosa se observa una disminución de la ratio  $F_{340}/F_{380}$  debido a que están actuando los mecanismos por los cuales se rellenan los depósitos intracelulares de calcio, y como consecuencia hay una disminución en la concentración de calcio intracelular. Posteriormente se observa la aparición de un transitorio, debido al cierre de los canales de potasio dependientes de ATP y apertura de los canales de calcio, tras el cual se inicia un patrón oscilatorio, que en el caso del registro del islote entero, las oscilaciones son regulares en cuanto a amplitud y frecuencia se refieren (figura 29).

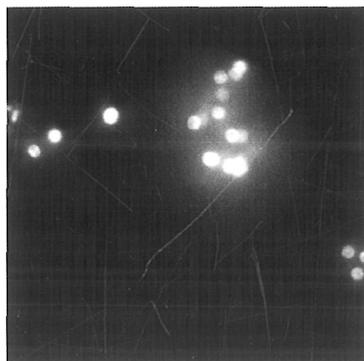


**Figura 29.** A. Registro de las oscilaciones de  $[Ca^{2+}]_i$  mediante la sonda fluorescente Fura-2. Se puede observar el transitorio debido al cierre de los canales de  $K^+_{ATP}$  y apertura de los canales de  $Ca^{2+}$  e inicio de la actividad oscilatoria. B. Imagen de un islote cargado con la sonda fluorescente a una concentración 3mM glucosa. C. Imagen del mismo islote en el pico del transitorio a una concentración 11mM glucosa.

El hecho de que las oscilaciones que se aprecian en estado estacionario a una concentración de 11mM glucosa presenten un patrón oscilatorio regular es debido a que el islote se comporta como un *sincitio*, donde las células permanecen acopladas a través de las *gap junctions*.

Por los resultados observados con los bloqueantes de dichas uniones en los que se modificaba la actividad eléctrica debido al desacoplamiento celular, cabría esperar que si el islote quedaba disgregado, se modificaría el patrón oscilatorio de forma significativa.

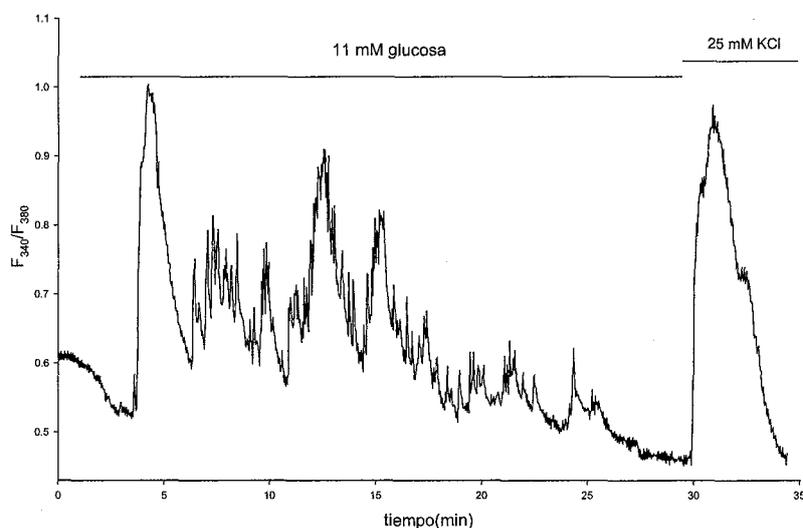
Por disgregación mecánica y enzimática se obtuvieron grupos celulares de distinto tamaño para determinar la variación de las oscilaciones de calcio intracelular en función del número de células acopladas (figura 30).



**Figura 30.** Cultivo de células pancreáticas. Se pueden observar los distintos tamaños poblacionales sobre los que se realizaron las mediciones de las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.

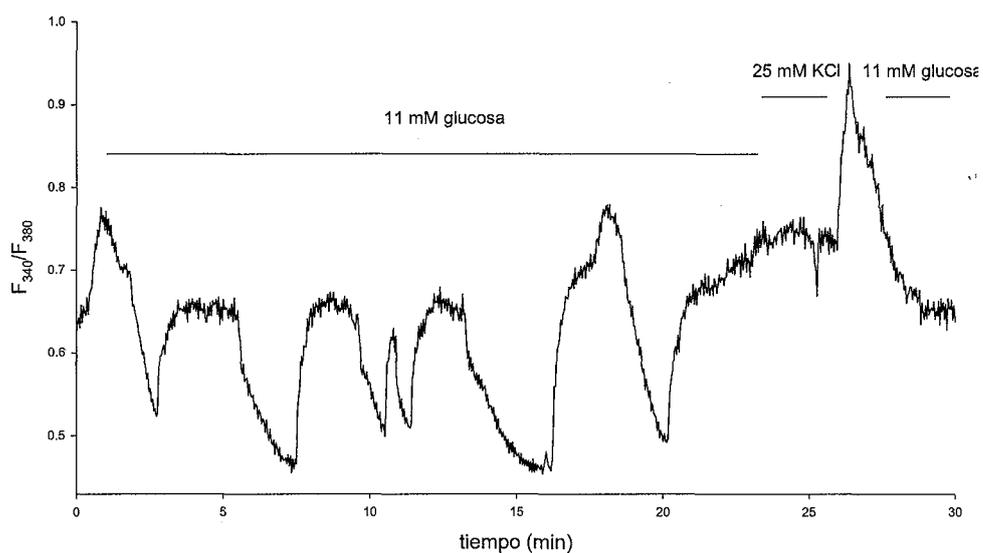
Posteriormente se incubó la sonda fluorescente fura-2 AM a una concentración de  $2 \mu\text{M}$ , durante una hora antes de cada registro. El cubre se transfirió a la cámara de registro del microscopio, donde se utilizó el mismo protocolo seguido para el islote entero.

Al registrar las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en células aisladas ( $n = 6$ ) se mostraban patrones caóticos en todos los casos, donde se alternaban oscilaciones lentas con la aparición de oscilaciones rápidas sin ninguna regularidad aparente (figura 31). Estos resultados coinciden con el supuesto de que las células aisladas por si solas no son capaces de generar el patrón oscilatorio que caracteriza a la célula  $\beta$  pancreática.

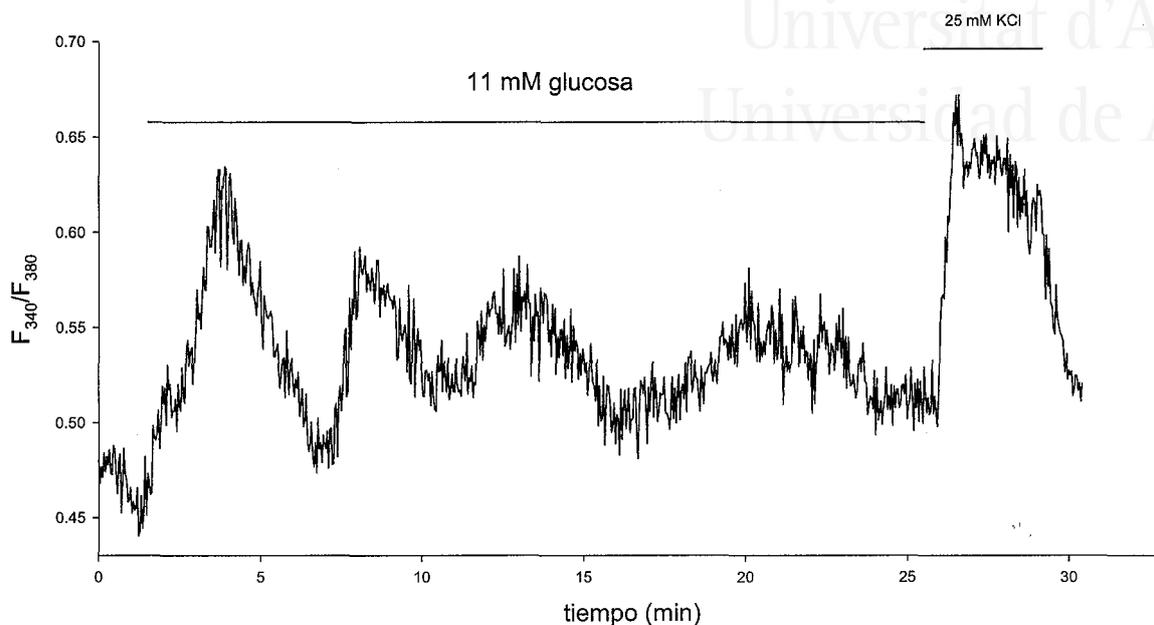


**Figura 31.** Registro mediante sonda fluorescente de una célula  $\beta$  pancreática aislada, mostrando un patrón de oscilación irregular, con la alternancia de oscilaciones rápidas y lentas.

Si se aumentaba el tamaño del grupo celular que se estaba registrando se puede apreciar una cierta organización de las oscilaciones. Éstas se mostraban más regulares en cuando a amplitud y frecuencia se refiere. El patrón mostrado por dichos registros se empezaba a parecer al patrón observado en el islote intacto ( figuras 32 y 33).



**Figura 32.** Registro mediante la sonda fluorescente fura-2 AM de un cluster de dos células. El patrón presentado es más regular en comparación con la célula aislada.

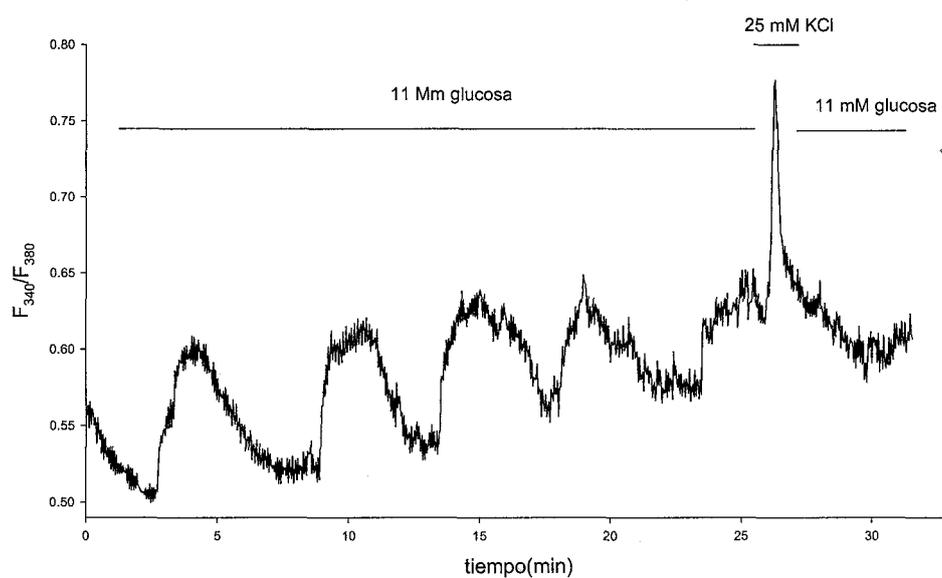


**Figura 33.** Registro mediante sonda fluorescente de un cluster compuesto por cuatro células  $\beta$  pancreáticas.

Cuando el grupo celular es lo suficientemente grande, la actividad oscilatoria que se presenta es equiparable al registrado en el islote entero (figura 34). Estos resultados están en concordancia con los modelos matemáticos que predicen un aumento de la regularidad de las oscilaciones a medida que se aumenta el número de células acopladas. No obstante, sigue existiendo cierta discrepancia para saber con certeza cual es el número mínimo de células que se necesitan para observar la aparición del patrón oscilatorio característico.

Experimentos realizados con grupos celulares de pequeño tamaño (3 y 4 células) han mostrado en ocasiones patrones regulares muy similares a los obtenidos en islote intacto. Lo que sí que se puede asegurar es que las células aisladas por sí solas no son capaces de generar dicho patrón, con lo que se deduce que es necesaria el establecimiento

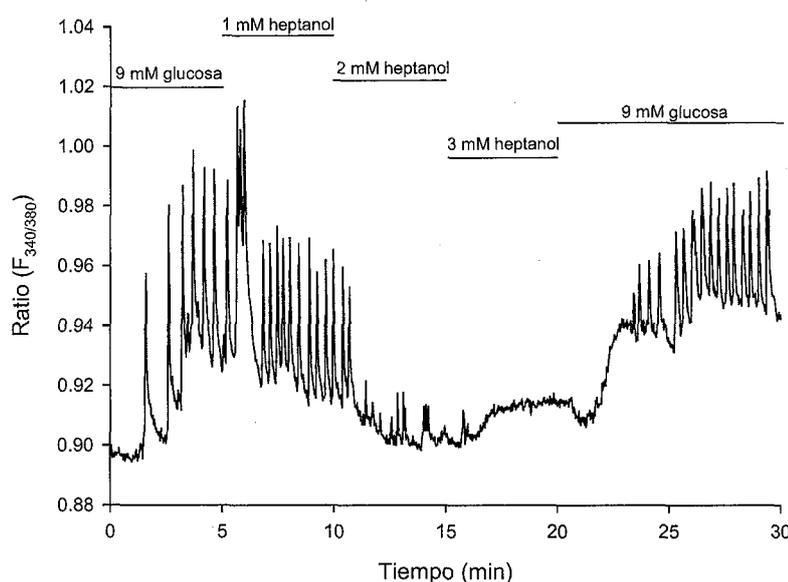
de comunicaciones intercelulares para el correcto funcionamiento del islote en cuanto a actividad eléctrica y, por consiguiente, oscilaciones de calcio intracelular se refieren.



**Figura 34.** Registro mediante sonda fluorescente de un cluster de 19 células. Se puede observar que las oscilaciones son regulares, equiparables al observado en el islote intacto.

### 3.3.1. Influencia del heptanol sobre las oscilaciones de calcio intracelular.

El islote se incubó con la sonda fluorescente Fura-2 AM a una concentración final de  $4\mu\text{M}$ . Sobre el mismo islote se realizó un protocolo donde se aplicaban concentraciones crecientes de heptanol, sobre una base de 9 mM glucosa y se midieron los cambios de fluorescencia asociados a los cambios en la concentración de calcio intracelular. En todos los experimentos ( $n = 5$ ) se observó que las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  disminuían de amplitud a medida que se aumentaba la concentración de heptanol. Con 1 mM heptanol en el medio de perfusión las oscilaciones reducían su amplitud en un 29.33%, mientras que con 2 mM heptanol había una reducción del 82.34%. Las oscilaciones de calcio desaparecían por completo cuando la concentración de heptanol aumentaba hasta 3mM (figura 35).



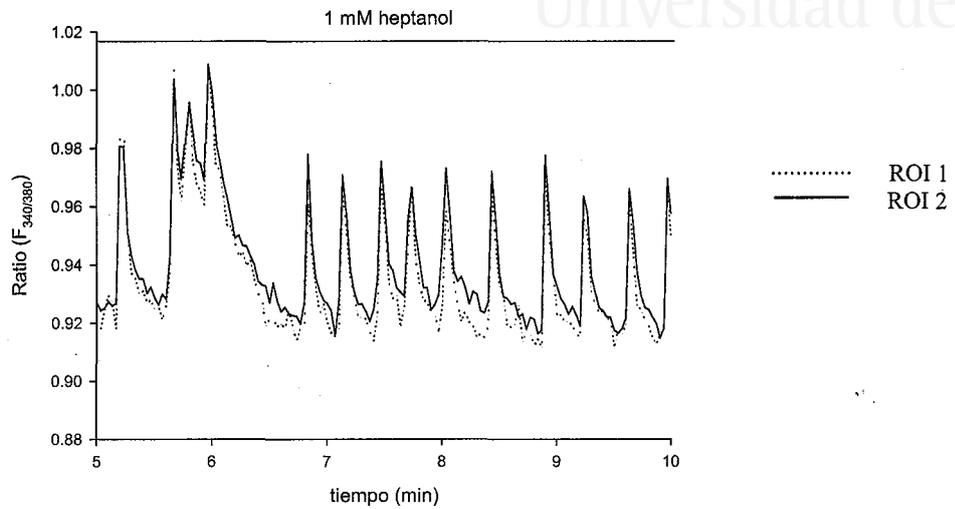
**Figura 35.** Influencia del heptanol a distintas concentraciones sobre las oscilaciones de calcio intracelular. A medida que se aumenta la concentración del bloqueante, las oscilaciones disminuyen su amplitud.

El efecto era reversible, puesto que al eliminar el heptanol del medio de perfusión el islote volvía a recuperar el patrón oscilatorio.

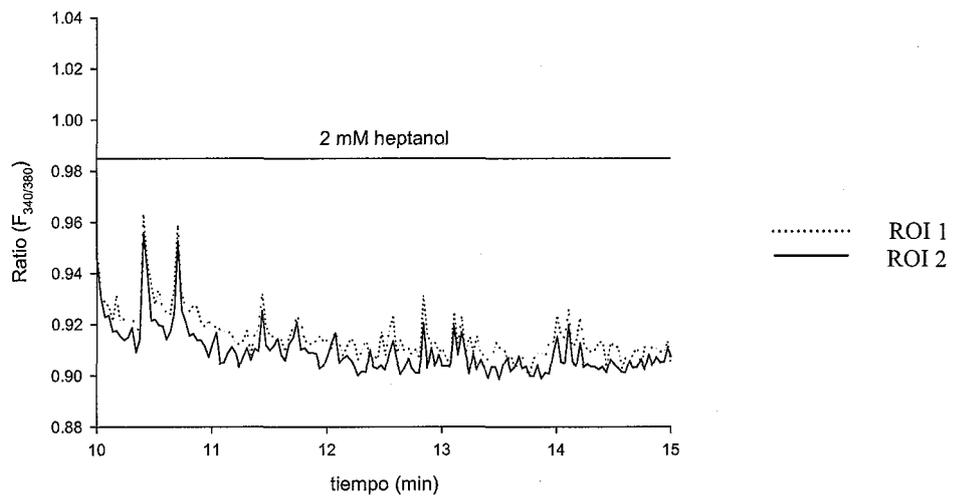
Para estudiar si el heptanol afectaba a la sincronización, dentro del mismo islote se delimitaron distintas áreas de interés (ROI) sobre las cuales se midieron las oscilaciones de calcio en función de la concentración de bloqueante. Todas las zonas elegidas oscilaban sincrónicamente en presencia de 9 mM glucosa

Sin embargo, y en contra de lo observado con el efecto que produce el heptanol sobre la actividad eléctrica, el bloqueante no es capaz de desincronizar las oscilaciones de calcio intracelular en ninguna de las zonas estudiadas en todos los casos registrados (figura 36).

A



B



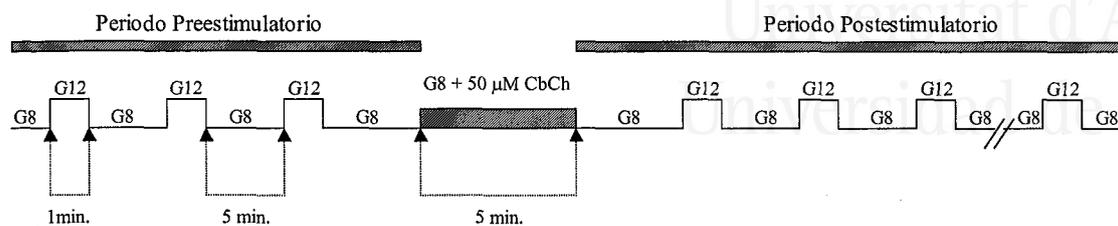
**Figura 36.** Efecto del heptanol sobre la sincronización de las oscilaciones de calcio dentro de un mismo islote. Todas las regiones estudiadas (ROI) oscilan de manera sincrónica tanto a 1 mM heptanol (A) como a 2 mM heptanol (B)

### **3.4. INFLUENCIA DEL ACOPLAMIENTO EN LA POTENCIACIÓN DE LA RESPUESTA ELÉCTRICA DE LA CÉLULA $\beta$ PANCREÁTICA.**

La mayoría de los estudios destinados a entender el proceso secretor asumen una respuesta constante a la estimulación con glucosa u otros secretagogos. Esta concepción implica aceptar que una determinada concentración de estimulante mezclado de los mismos producirá siempre una misma respuesta de las células  $\beta$ . Sin embargo, existen evidencias que permiten suponer diversos grados de variabilidad en esta respuesta.

#### **3.4.1. Potenciación de la respuesta eléctrica de la célula $\beta$ pancreática.**

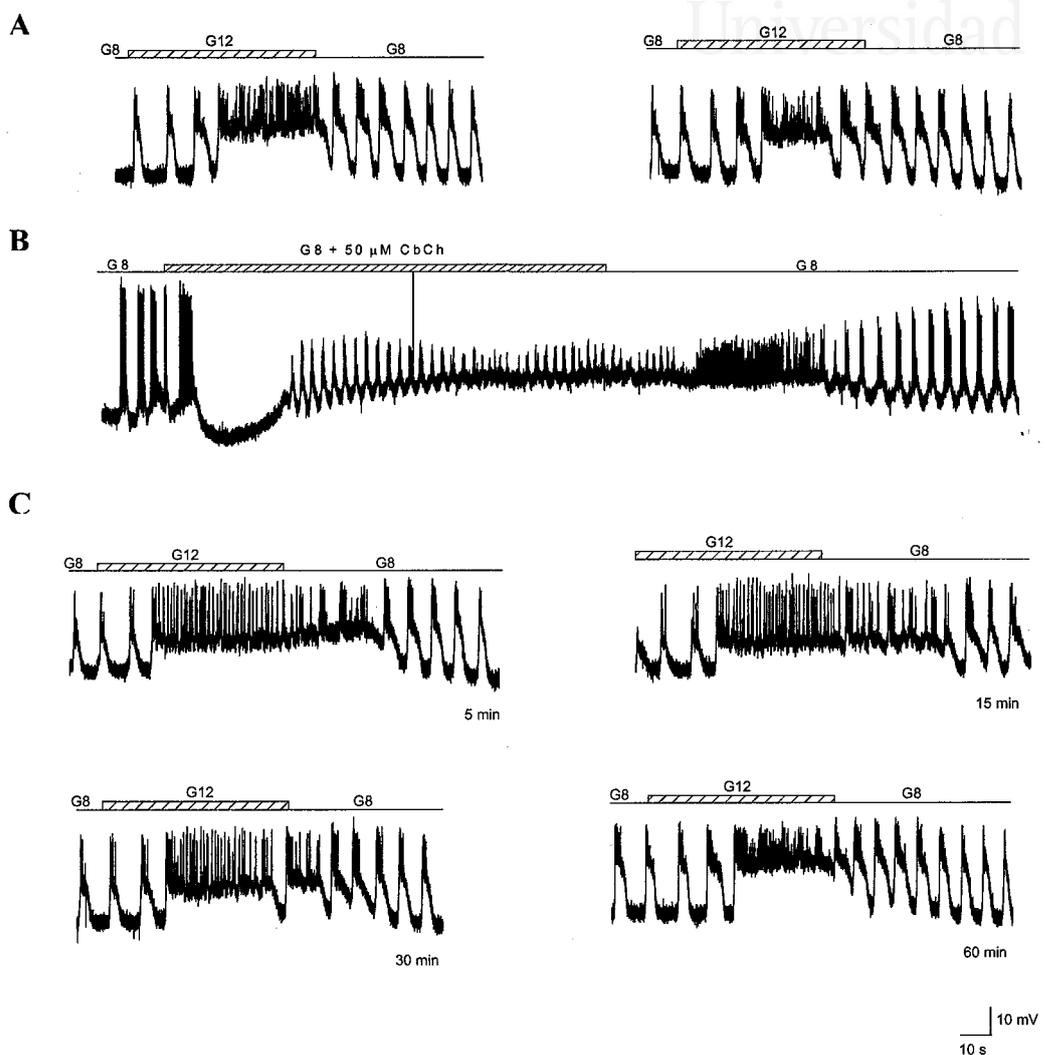
Para los experimentos control, se planteó un protocolo en el que se replicaban los resultados obtenidos anteriormente por nuestro grupo de investigación (Pomares, 2001) en el que se comprobaba la variación de la respuesta de la célula a cambios en la concentración de glucosa (pulsos de glucosa) después de la aplicación de carbacol (en presencia de 8 mM glucosa). Para ello, se definió un *período preestimulatorio* donde se aplican 3-4 pulsos de glucosa (se entiende por pulso de glucosa el cambio de concentración de 8 mM glucosa a 12 mM glucosa durante un minuto, para volver a 8 mM glucosa transcurrido dicho período de tiempo). Este período se toma como control. Después de este período preestimulatorio se procede a la aplicación de un *pulso estimulador de carbacol* (50  $\mu$ M) durante cinco minutos en presencia de glucosa 8 mM. Transcurridos los cinco minutos, se pasa a un *período postestimulatorio*, que consiste en volver a aplicar pulsos de glucosa durante un tiempo medio aproximado de 60-120 minutos (figura 37).



**Figura 37.** Protocolo utilizado para analizar la variabilidad de la respuesta a glucosa. Se aplican 3-4 pulsos de glucosa separados entre sí por un tiempo de 5 min. El Carbacol (50  $\mu$ M) se aplica en presencia de glucosa 8 mM durante 5 min. Eliminamos el Carbacol del medio y se deja que la célula recupere el patrón eléctrico equiparable al control. A continuación se vuelven a aplicar pulsos de glucosa.

Cada célula sirve como control interno, dada la variabilidad de respuesta existente entre células para idénticas concentraciones de estimulador. El parámetro elegido para cuantificar la potenciación fue el área comprendida entre una línea base (nivel de potencial en fase silente mínimo) y el nivel de potencial de la célula durante el tiempo en que se produce la aplicación de un pulso de glucosa. Se midieron las áreas antes y después de la aplicación del carbacol, para posteriormente llevar a cabo una normalización de los resultados en base a los datos del período control. Para los análisis cuantitativos sólo se tuvieron en cuenta aquellas células que mantenían la amplitud de los *bursts* estables, antes y después de la aplicación del agonista.

Al comparar la respuesta de la célula  $\beta$  a los pulsos de glucosa antes y después de la aplicación de 50  $\mu$ M carbacol, podemos observar una disminución de la fase silente y por lo tanto un aumento de la fase activa. La célula presenta un incremento o potenciación de su actividad eléctrica en respuesta a los pulsos de glucosa. Dicha potenciación se trata de un fenómeno duradero, ya que aún eliminando el carbacol del medio el efecto se prolonga en el tiempo (figura 38).

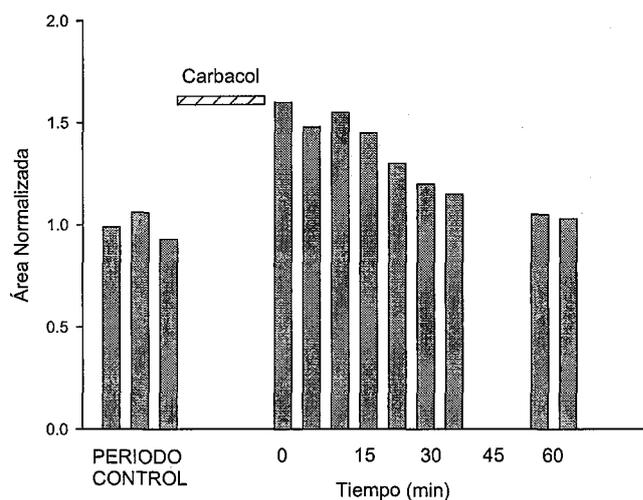


**Figura 38.** Respuesta típica de la célula  $\beta$  al protocolo de carbacol en presencia de glucosa. **A.** Pulsos de glucosa control. **B.** Efecto típico del carbacol (50 $\mu$ M) en presencia de glucosa (8 mM). **C.** Respuesta de la célula  $\beta$  a los pulsos de glucosa después de la estimulación con carbacol.

Tras unos 30-40 minutos de la aplicación de carbacol, la célula vuelve a los niveles control del periodo preestimulatorio. Podemos hablar de la existencia de un fenómeno de potenciación temporal de la sensibilidad de la célula  $\beta$  a los cambios en la concentración de glucosa. Esta potenciación implicaría que tras la estimulación con carbacol y glucosa la célula es capaz de responder a los posteriores estímulos de glucosa con un incremento en el grado de actividad.

### 3.4.2. Cuantificación de la potenciación.

Tras la aplicación del carbacol se puede observar como la respuesta eléctrica de la célula a los pulsos de glucosa se incrementa con respecto al control. Por lo tanto, la aplicación de carbacol en presencia de glucosa produce una potenciación de la sensibilidad de la célula  $\beta$  a los cambios de glucosa (figura 39)



**Figura 39.** Comparación entre la despolarización obtenida antes y después de la aplicación de carbacol mediante el análisis de las áreas comprendidas entre una línea base y el nivel de potencial de la célula durante el tiempo que dura el pulso de glucosa.

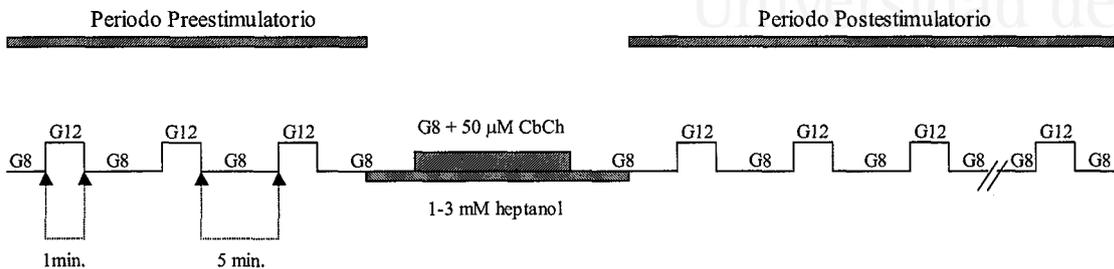
Los análisis llevados a cabo muestran un incremento medio del 75% en el primer pulso de glucosa tras el estímulo con carbacol, de un 47% en el segundo pulso y de un 37% en el tercero en las células analizadas ( $n = 9$ ).

### **3.4.3. Papel del acoplamiento celular en la potenciación eléctrica de la célula $\beta$ pancreática.**

Como se ha demostrado en los experimentos anteriores, la potenciación existente en la célula  $\beta$  pancreática constituye un fenómeno de naturaleza muscarínica, ya que el efecto está bloqueado por la aplicación de atropina (Pomares, 2001). Entre los diversos mecanismos potencialmente implicados en la aparición de dicha potenciación se encuentran los canales de  $K^+_{ATP}$ , la entrada de calcio extracelular, como mecanismo secundario al cierre de los canales de  $K^+_{ATP}$ , el calcio procedente de los reservorios intracelulares y la posible implicación la PKC.

Un mecanismo aún no testado es la implicación que posee el acoplamiento celular en la aparición de dicha potenciación. Parece ser un fenómeno colectivo en donde el acoplamiento celular sería otro factor a tener en cuenta, además de los citados anteriormente, para observar el aumento de la respuesta eléctrica de la célula  $\beta$ .

Para comprobar la influencia del acoplamiento celular en dicho aumento de actividad se diseñó un protocolo donde previo a la aplicación del estímulo con carbacol, se desacoplaban las células mediante el uso de heptanol. El objetivo de dicho protocolo era saber si con las células desacopladas aparecía la potenciación, y por lo tanto no era un fenómeno de naturaleza colectiva sino individual. El pulso de carbacol no se aplicaba hasta que no se observaba el efecto del bloqueante de las gap, bien por la homogeneización de las espigas o por el cese de la actividad eléctrica (figura 40).



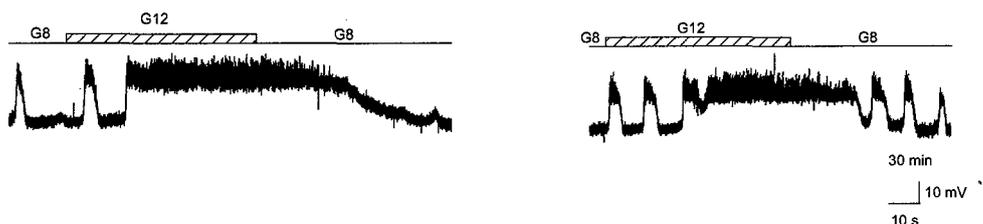
**Figura 40.** Protocolo utilizado para comprobar la existencia de potenciación en la célula  $\beta$  pancreática en presencia de bloqueantes de las *gap junctions*. Minutos antes de la aplicación del pulso de carbacol, se aplicaba heptanol para bloquear las uniones intercelulares.

Cuando se empleaban concentraciones de 1mM de heptanol y aparecía la homogeneización de las espigas sobre la célula registrada se aplicaba el correspondiente estímulo de carbacol. Tras la retirada del mismo y del bloqueante, se seguía el protocolo de pulsos postestímulo para apreciar la aparición del fenómeno de potenciación. En este caso, aunque las comunicaciones intercelulares empiecen a bloquearse, no están lo suficientemente cerradas como para impedir la aparición del fenómeno. Aunque haya pocas células acopladas, sigue habiendo un aumento de actividad eléctrica tras la aplicación del estímulo (figura 41).

## A. CONTROL

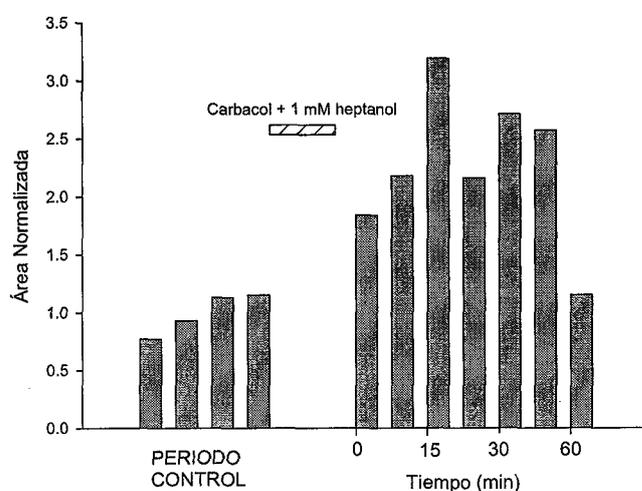


## B. TRATAMIENTO: 1mM heptanol



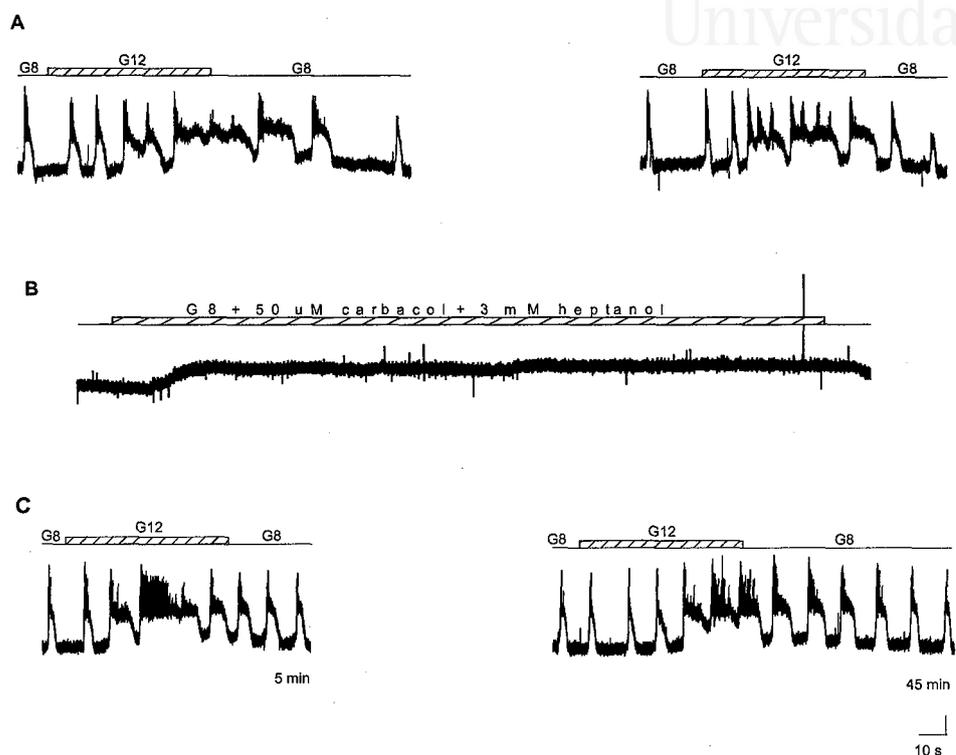
**Figura 41.** Respuesta de la célula  $\beta$  al protocolo de carbacol en presencia de glucosa y 1 mM heptanol **A.** Pulsos control. **B.** Respuesta de la célula  $\beta$  a los pulsos de glucosa después de la estimulación. Se puede observar un aumento de la actividad eléctrica, aún en presencia del bloqueante a concentración 1 mM heptanol.

De todas las células analizadas a las que se les aplicó una concentración de 1mM heptanol ( $n = 5$ ), se observó que en el 80% de los casos existía un aumento de la actividad eléctrica tras la aplicación del estímulo, como así lo demuestra también la cuantificación de dicha potenciación, donde en algunos casos se superaba el 100 % en el primer pulso (figura 42).



**Figura 42.** Comparación entre la despolarización obtenida antes y después de la aplicación de carbacol en presencia de 1 mM heptanol mediante el análisis de las áreas comprendidas entre una línea base y el nivel de potencial de la célula durante el tiempo que dura el pulso de glucosa.

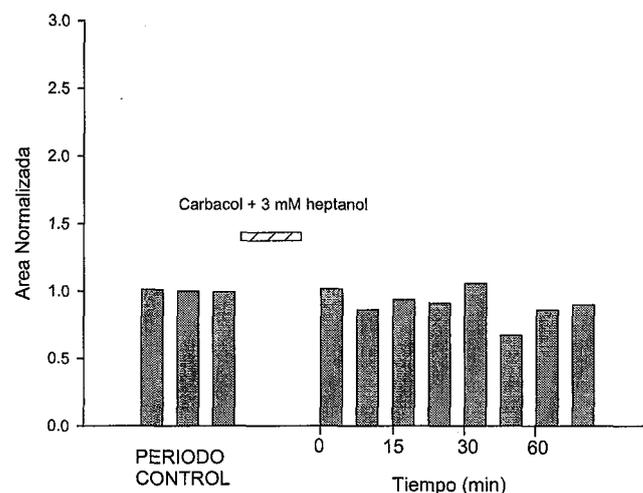
Para asegurar que las células estaban desacopladas se pasó directamente al uso de concentraciones superiores de bloqueante. El protocolo seguido es el mismo que en los casos anteriores. En este caso, se usó una concentración de 3mM heptanol. La célula entraba en fase silente, sin actividad en forma de *bursts*. Es en este estado cuando se aplicaba el pulso de carbacol durante cinco minutos. A diferencia de lo observado anteriormente, del total de células registradas ( $n = 8$ ), en un 87.5% no aparecía el fenómeno de potenciación (figura 43). Es decir, en un estado en el que se supone que las células permanecen totalmente desacopladas no se observa un aumento de la actividad.



**Figura 43.** Respuesta de la célula  $\beta$  al protocolo de carbacol en presencia de glucosa y 3 mM heptanol. **A.** Pulsos control. **B.** Efecto del carbacol 50 $\mu$ M y 3 mM heptanol. **C.** Respuesta de la célula  $\beta$  a los pulsos de glucosa después del periodo de estimulación. Se puede observar que no existe un aumento en la actividad eléctrica de la célula.

Al aplicar el agente muscarínico sobre el heptanol a una concentración de 3 mM se puede observar la despolarización de la membrana producida por la acción del carbacol. A estas elevadas concentraciones de bloqueante el carbacol es capaz de inducir su acción.

Si atendemos a la cuantificación realizada en las células registradas, podemos observar que efectivamente el aumento de la actividad eléctrica tras la estimulación con carbacol y heptanol a estas concentraciones no es significativo (figura 44).



**Figura 44.** Comparación entre la despolarización obtenida antes y después de la aplicación del carbacol en presencia de 3mM heptanol mediante el análisis de las áreas comprendidas entre una línea base y el nivel de potencial de la célula durante el tiempo que dura el pulso de glucosa.

Por lo tanto, es presumible, con los datos expuestos anteriormente, que el fenómeno de potenciación de la actividad eléctrica que se observa en la célula  $\beta$  pancreática sea un fenómeno complejo, en donde además de la posible necesidad de la despolarización de la membrana debido al cierre de los canales  $K^+_{ATP}$  y entrada de calcio (Pomares, 2001), sea necesario que las células mantengan las comunicaciones intercelulares funcionales para la aparición de un aumento de la actividad eléctrica tras la estimulación con carbacol.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## **4. DISCUSIÓN**

#### 4.1. IMPORTANCIA DEL ACOPLAMIENTO CELULAR EN LA APARICIÓN DEL PATRÓN OSCILATORIO.

La aparición de patrones oscilatorios es un hecho común de los sistemas excitables. Un caso particular lo encontramos en la célula  $\beta$  pancreática. Se ha demostrado tanto *in vivo* como *in vitro* que la actividad eléctrica de la célula  $\beta$  pancreática es oscilatoria dentro de los rangos de concentraciones fisiológicas de glucosa (Sanchez-Andres *et al.*, 1995; Valdeolmillos *et al.*, 1996; Antunes *et al.*, 2000).

Esta propiedad parece deberse al acoplamiento existente entre las células secretoras de insulina a través de las *gap junctions*. Dicho acoplamiento dota al sistema de un alto grado de coordinación de la señal, evitando la desensibilización y permitiendo una mayor modulación en frecuencia, duración y amplitud (Soria, 1998(Charollais *et al.*, 2000). Numerosos experimentos han sugerido que tales canales de comunicación contribuyen al correcto funcionamiento del islote como un *sincitio* en términos de actividad eléctrica y oscilaciones de calcio, traducándose en una liberación pulsátil de insulina.

Sin embargo, cuando las células  $\beta$  pancreáticas se encuentran aisladas, sin establecer ninguna comunicación física con otras células, la biosíntesis de insulina se encuentra reducida, particularmente en respuesta a concentraciones fisiológicas de glucosa que estimulan a los islotes pancreáticos (Meda, 1996). Incluso se puede observar que en las células tumorales que presentan características anómalas en la maquinaria de secreción no expresan conexina, proteína que forma parte del canal de comunicación y que por lo tanto permanecen desacopladas (Vozzi *et al.*, 1995).

La ausencia o disminución de la liberación de insulina puede desencadenar la aparición de la diabetes tipo I o II respectivamente, con lo que es totalmente necesario la sincronización entre las células  $\beta$  pancreáticas a través de las *gap junctions*, ya que este

hecho dota al sistema de una sincronización que se traduce en una correcta liberación de la hormona insulina, para mantener las concentraciones de glucosa en sangre dentro de unos rangos apropiados (Ravier *et al.*, 2005).

#### **4.1.1. El bloqueo de la comunicación intercelular impide la aparición del patrón oscilatorio en la célula $\beta$ pancreática.**

Por los resultados obtenidos en la realización de esta tesis se puede comprobar cómo la aparición de la actividad eléctrica es una propiedad emergente de un grupo de células acopladas entre sí mediante las *gap junctions* o uniones en hendidura. Dichos canales, a parte de permitir el paso de iones inorgánicos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , etc..) y pequeñas moléculas tales como cAMP e  $\text{IP}_3$  (Saez *et al.*, 1989; Kumar & Gilula, 1996), son fundamentales para mantener una comunicación eléctrica en el islote.

A concentraciones subestimuladoras de glucosa, la célula  $\beta$  pancreática permanece hiperpolarizada y mantiene su potencial de reposo próximo al potencial de equilibrio del  $\text{K}^+$  (Ashcroft *et al.*, 1984; Ashcroft & Rorsman, 1990) en torno a  $-70$  mV. Al aplicar concentraciones estimuladoras de glucosa ( $> 7$  mM), la célula presenta una *fase inicial*, donde se despolariza hasta un nivel umbral en torno a  $-40$  mV y muestra un espigote continuo durante al menos 2-3 min. Esto se debe al cierre de los canales de  $\text{K}^+_{\text{ATP}}$  debido a un aumento intracitoplasmático de ATP como consecuencia del metabolismo de la glucosa. Tras esta primera fase, la célula repolariza de nuevo y entra en la siguiente fase de actividad, donde el potencial de membrana de la célula oscila entre dos niveles. Es la llamada fase de *actividad oscilatoria*, tal y como se muestra en la figura 3. En la aparición de dicha actividad están implicados todos los canales que se han detallado en el apartado 1.1.4. de la presente tesis. Pero además de todo lo descrito aquí, es fundamental mantener las comunicaciones intercelulares funcionales para observar la actividad oscilatoria en la célula  $\beta$  pancreática.

Los experimentos realizados han estado encaminados a la búsqueda de unas conclusiones que nos permitieran saber cómo de importantes son las comunicaciones celulares para establecer la aparición del patrón oscilatorio en la célula  $\beta$  pancreática. Por ello, y según lo descrito en el apartado 3.1.1. donde se expone el protocolo experimental utilizado, se buscó una herramienta útil que permitiera bloquear las comunicaciones intercelulares de forma dosis-dependiente y observar cómo variaba la actividad eléctrica en función del grado de acoplamiento establecido entre las células.

En condiciones normales, donde las comunicaciones intercelulares son funcionales, se puede observar la aparición del patrón oscilatorio característico de la célula  $\beta$  pancreática (figura 15) y ampliamente descrito por numerosos estudios (Dean & Matthews, 1968; Ashcroft & Rorsman, 1989; Sanchez-Andres *et al.*, 1995). Dicho patrón oscilatorio es debido a que las células están acopladas eléctricamente a través de las *gap junctions*. La conexina es el componente proteico principal de las uniones en hendidura. En el modelo animal elegido, el ratón, es la conexina 36 la que forma parte del canal (Serre-Beinier *et al.*, 2000; Moreno *et al.*, 2005).

Cuando se observa detenidamente las poblaciones de espigas de calcio que aparecen sobre un *burst* control se puede observar una distribución heterogénea, atendiendo a la amplitud de espiga desde un nivel base hasta el pico de cada espiga (figura 16). Cuando se aplicaban concentraciones de 1 mM heptanol lo que se observaba era una homogeneización de amplitudes de espiga generadas en cada *burst*. En este caso, sólo se observaban las espigas que poseían mayores amplitudes y eran las más rápidas, desapareciendo las de menor amplitud y más lentas (figura 20). Este efecto induce a pensar que la distribución heterogénea de espigas que se observa en la situación control no sigue un patrón aleatorio sino que atiende a la organización de las células  $\beta$  pancreáticas en grupos celulares interconectadas entre sí. De esta forma, las espigas que poseen mayor amplitud son las espigas generadas en la propia célula que se está registrando, mientras que aquellas espigas

que poseen menor amplitud, y por consiguiente, más lentas, están generadas en células vecinas, próximas a la célula que se está registrando y que se propagan a través de la *gap junctions*.

Si se ordenan las espigas atendiendo a su amplitud y se representan gráficamente, se observa una caída exponencial, y no lineal, de amplitudes (figura 17). El mismo fenómeno ocurre si se representan las pendientes de despolarización o repolarización de cada espiga, en donde aquellas espigas con mayor pendiente son las más rápidas. Esta disminución exponencial sugiere que la señal ha atravesado filtros RC que constituyen las *gap junctions*. Si la reducción de amplitudes o en la pendiente de despolarización fuera consecuencia de un proceso de inactivación, se observaría una reducción gradual a lo largo de las fases activas. Por el contrario, lo que se observa son potenciales de acción mezclados, sin orden aparente (figura 16). Estos datos son compatibles con la hipótesis de que los potenciales de acción de mayor amplitud se generan en la célula que se está registrando, mientras que los de menor amplitud se producen en células vecinas y se registran tras la propagación a través de las conexiones eléctricas intercelulares, que se deberían comportar como filtros RC.

El hecho de que los potenciales de acción de menor amplitud se han generado en células próximas y se han transmitido a través de las *gap junctions* hasta la célula que se está registrando nos está indicando que efectivamente se establece una comunicación eléctrica dentro del islote a través de las comunicaciones intercelulares. Por lo tanto, al registrar la actividad eléctrica en un par de células lo suficientemente cercanas una de la otra cabría esperar que dicha actividad fuera sincrona en ambas células, si las comunicaciones intercelulares permanecen funcionales. Efectivamente, al realizar el registro doble simultáneo de dos células  $\beta$  pancreáticas se corrobora lo expuesto anteriormente (figura 18). Este hecho induce a pensar que el islote se comporta como un *sincitio* gracias al establecimiento de comunicaciones eléctricas.

Como se ha expuesto anteriormente, al aplicar concentraciones de 1 mM de heptanol la distribución heterogénea de los potenciales de acción desaparece. Sólo se observa la aparición de aquellas espigas que presentan amplitudes mayores (figura 20). Sin embargo, el patrón oscilatorio se sigue manteniendo. El hecho de que exista una homogeneización de las espigas parece deberse al cierre parcial de las comunicaciones intercelulares, impidiendo la propagación de los potenciales de acción menores, generados en las células más distantes. No obstante, dicha interrupción parcial de la comunicación no es suficiente como para impedir la generación del patrón oscilatorio.

Diversos mecanismos pueden estar implicados en la imposibilidad de registrar los potenciales de acción generados en células vecinas y propagados a través de las *gap junctions* cuando se aplica heptanol en el medio de perfusión. Entre ellos cabe destacar una disminución del número de comunicaciones celulares o una reducción de conductancia de los canales de potasio y calcio. Sin embargo, uno de los posibles mecanismos sería una disminución en la probabilidad de apertura de las *gap junctions*. La explicación de este hecho podría basarse en que el heptanol, a estas concentraciones, causa una interferencia con la estructura de la bicapa lipídica fluidificando la membrana, e indirectamente perturba la conformación de las *gap junctions* provocando cambios en el estado funcional de los canales (Takens-Kwak *et al.*, 1992) y disminuyendo el acoplamiento eléctrico existente entre las células  $\beta$  pancreáticas.

La interrupción de las comunicaciones celulares por el heptanol sugiere una interacción directa del alcohol sobre un componente de la membrana, más que un mecanismo indirecto de acción, como podría ser un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, un aumento del pH o a la activación de una cascada de reacciones de fosforilación (Bastide *et al.*, 1995).

Se podrían descartar las variaciones de pH para explicar dicho fenómeno puesto que se encuentra bien tamponado debido a las condiciones del experimento.

Si atendemos a la distribución de las espigas presentadas por las condiciones control y cuando se aplica el tratamiento con 1mM heptanol se observan claras diferencias. En las condiciones en las que las comunicaciones intercelulares permanecen funcionales se puede observar una distribución bimodal de las espigas, hecho que coincide con los estudios publicados por Soria *et al.* en 1986. Claramente se pueden observar dos poblaciones distintas de espigas atendiendo a su amplitud. Unas centradas en torno a los 15 mV y otras poblaciones con mayores amplitudes centradas alrededor de los 30 mV (figura 26). Sin embargo, al interrumpir las comunicaciones intercelulares con el heptanol a concentraciones de 1mM se puede observar claramente que las poblaciones de menor amplitud desaparecen, quedando sólo aquellas pertenecientes a la célula que se está registrando.

El hecho de que efectivamente el heptanol está interfiriendo en la comunicación intercelular se puede corroborar realizando registros dobles simultáneos. Atendiendo a los resultados obtenidos en nuestros experimentos, se puede determinar que las células registradas presentan el patrón oscilatorio, pero éste ya no es totalmente sincrónico (figura 21). Si bien el grado de desacoplamiento inducido por 1mM de heptanol permite observar cómo algunos *bursts* de ambas células poseen cierta sincronía, en otros casos se observa cómo se va perdiendo dicha sincronización y las células empiezan a oscilar de forma independiente una de la otra debido a interrupción de las uniones *gap*.

Cuando se aplican concentraciones de 2 mM heptanol sobre el islote y se registra la actividad eléctrica se puede comprobar que dicha actividad en forma de *bursts* desaparece (figura 22). La célula permanece en un estado despolarizado y sobre el cual se puede observar un espiguelo continuo. En este caso, la célula registrada no es capaz de recuperar el potencial de membrana de reposo situado en torno a los  $-70$  mV y su potencial se sitúa en torno a  $-40$  mV. Este fenómeno descrito coincide con uno de los posibles estados propuestos por los modelos matemáticos cuando la célula  $\beta$  pancreática se encuentra aislada (Smolen

*et al.*, 1993; Andreu *et al.*, 1997; Kinard *et al.*, 1999; Bertram & Sherman, 2000). El posible cierre de la comunicación intercelular debido a la acción del bloqueante produce que la célula que se está registrando ya no se encuentre acoplada eléctricamente al resto de células y que por lo tanto no sea capaz de generar el patrón oscilatorio característico del islote pancreático. Así, pues, se podría postular que la actividad oscilatoria resulta de una cooperación de células con propiedades diferentes, cada una de las cuales, aislada, produce una forma simple de actividad. Mediante modelos matemáticos se ha demostrado que a través de las uniones *gap* una célula que esté oscilando puede inducir a otra que no muestre este patrón a oscilar. (Rocheleau *et al.*, 2006), de ahí la importancia de la comunicación intercelular y la aparición del patrón oscilatorio.

Al realizar el registro doble intracelular en presencia de 2 mM heptanol se puede observar que ambas células registradas muestran un patrón totalmente independiente la una de la otra (figura 24), ya que se comportan como si de células aisladas se trataran, hecho que contrasta con lo observado al realizar registro doble en condiciones control, donde las *gap junctions* permanecen funcionales y la actividad de ambas células es totalmente sincrona.

Al aplicar una concentración de 3 mM heptanol se puede observar como la célula hiperpolariza y se mantiene en estado silente mientras el heptanol está presente en el medio de perfusión (figura 25). Aunque este estado también coincide con uno de los comportamientos descritos para célula aislada expuesto por los modelos matemáticos, posiblemente a estas concentraciones tan elevadas del alcohol se esté afectando otros parámetros (Perez-Armendariz *et al.*, 1991; Keevil *et al.*, 2000). En diferentes sistemas en los cuales se estudió el efecto del heptanol se observó que a elevadas concentraciones se activaban corrientes de potasio, hiperpolarizando la membrana. Este hecho es coincidente con lo observado en la célula  $\beta$  pancreática a estas concentraciones, donde la célula registrada permanece hiperpolarizada, posiblemente por la activación de los canales de

$K^+_{ATP}$ . Al hiperpolarizar la membrana celular, los canales de calcio dependientes de voltaje se bloquean, con la consiguiente inhibición de la entrada de calcio del espacio extracelular.

Este hecho es consistente con los registros de calcio realizados a distintas concentraciones de bloqueante, en donde las oscilaciones de calcio disminuyen su amplitud conforme la concentración de heptanol en el medio aumenta (figura 35), datos consistente con los descritos para otros sistemas (Matchkov *et al.*, 2004) en donde el heptanol disminuye la concentración de calcio de forma dosis-dependiente. Sin embargo, el heptanol no es capaz de desincronizar las oscilaciones de calcio (figura 36). Posiblemente algún elemento extracelular difusible es capaz de sincronizar las oscilaciones aún en presencia del bloqueante de las *gap* o el nivel de conectividad intercelular requerido para la sincronización de las oscilaciones de  $Ca^{2+}$  es menor que el necesario para sincronizar la actividad eléctrica.

Si centramos la atención en los datos de resistencia de entrada medidos para diferentes concentraciones de heptanol, podemos observar un aumento de la  $R_I$  en todos los casos. Sin embargo a 3 mM heptanol el aumento de la resistencia de entrada es menor que el observado a concentraciones menores del bloqueante. Se han descrito casos similares en los que no se observaban aumentos de resistencia celular al aplicar distintos bloqueantes de la misma naturaleza. Como previamente se ha descrito, el heptanol afecta al ambiente lipídico de la membrana celular, interfiriendo sobre las uniones gap. Sin embargo, al aplicar concentraciones elevadas se afecta a la estabilidad de la membrana, ya que se produce una fluidificación debido a la naturaleza lipofílica del heptanol (Matchkov *et al.*, 2004), lo que puede explicar que se registren unos aumentos menores de la resistencia de entrada celular.

Cabe destacar que todos los efectos producidos por el heptanol, tanto en términos de actividad eléctrica, resistencia de entrada y oscilaciones de calcio son reversibles. La células recuperan los parámetros iniciales una vez el bloqueante ha sido eliminado del medio. Aunque no se puede descartar que el heptanol a elevadas concentraciones posea

efectos secundarios, se puede asegurar que los efectos producidos no afectan a la viabilidad celular y que por lo tanto presumiblemente sean debidos a un bloqueo de las comunicaciones intercelulares.

Existen un gran número de teorías y modelos matemáticos que tratan de explicar el hecho de que las células  $\beta$  pancreáticas aisladas no son capaces de generar el patrón oscilatorio, aunque posean la maquinaria celular suficiente para lograrlo. Entre ellas se encuentra la llamada “hipótesis de heterogeneidad “ propuesta por Smolen en 1993, en la que se postula que el mecanismo para generar el patrón oscilatorio es endógeno a cada célula pero que dicho patrón no se manifiesta en las células aisladas debido a que sus parámetros permanecen fuera del estrecho rango necesario para desencadenarlo. Esta heterogeneidad puede que persista en el islote intacto, pero es difícil de observar debido a que las células permanecen bien sincronizadas debido al acoplamiento eléctrico.

Otro de los mecanismos propuestos se basa en la diferencia de amplitudes de corriente de determinados canales. Göpel propuso que las amplitudes de corriente de los canales de calcio dependientes de voltaje y los canales de  $K_{Ca}$  son menores que las mostradas en el islote intacto, y que este hecho impediría que la célula aislada mostrara el patrón oscilatorio (Gopel *et al.*, 1999).

Nuestros datos muestran que la actividad oscilatoria en el islote se pierde cuando la célula se encuentra expuesta a concentraciones de 2 mM heptanol. En este estado, la célula permanece en un estado despolarizado, sobre el cual se muestra un patrón de espigeo continuo. Este hecho coincide con lo expuesto por los modelos matemáticos (Zhang *et al.*, 2003), en donde pequeñas inyecciones de corriente artificiales sobre estas células eran capaces de hiperpolarizar el potencial de membrana y conseguir que se muestre la actividad oscilatoria (Bertram *et al.*, 2000).

Aunque la contribución de los distintos canales que aparecen en la membrana de la célula  $\beta$  pancreática y su implicación en la aparición del patrón oscilatorio sea un mecanismo a tener en cuenta, cabe destacar que una parte importante de las diferencias observadas entre células aisladas y los islotes se pueden atribuir a la ausencia del acoplamiento celular a través de las *gap junctions* como se ha expuesto en esta tesis y otros autores han descrito (Gylfe *et al.*, 1991; Valdeolmillos *et al.*, 1993; Bergsten *et al.*, 1994; Nadal *et al.*, 1999)

#### **4.1.2. Las oscilaciones de calcio intracelular modifican su regularidad en función del tamaño del grupo celular.**

Numerosos estudios han revelado que el islote exhibe un patrón de oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  sincronas con la actividad eléctrica. Cada transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  es debido a la entrada de dicho ión durante la respectiva fase de despolarización de la actividad eléctrica (Santos *et al.*, 1991). El islote pancreático puede mostrar cuatro tipos diferentes de oscilaciones de calcio (Hellman *et al.*, 1992) y todas ellas muestran un patrón oscilatorio muy homogéneo (figura 29). Las oscilaciones ocurren de manera sincrona a lo largo de todo el islote, indicando que las células  $\beta$  pancreáticas se intercomunican rápidamente, a través de las *gap junctions*. Hay evidencias que apoyan la idea de que las comunicaciones intercelulares juegan un papel importante en el acoplamiento eléctrico y metabólico del islote entero (Bertuzzi *et al.*, 1999). Medidas de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en células  $\beta$  aisladas han demostrado que segregan insulina de una forma menos efectiva que si están integradas dentro del islote (Grapengiesser *et al.*, 1988). Dicho proceso parece indicar que la comunicación intercelular a través de las *gap junctions* es esencial para optimizar las respuestas a los cambios de glucosa. En base a esta premisa, al registrar células aisladas se pierde el patrón homogéneo mostrado por el islote entero, y las oscilaciones son muy irregulares en cuanto a amplitud y frecuencia se refiere (figura 31). Los resultados obtenidos están en concordancia con los

expuestos anteriormente (Salomon & Meda, 1986; Hellman *et al.*, 1992; Jonkers *et al.*, 1999).

La célula  $\beta$  pancreática aislada es capaz de generar un patrón oscilatorio, aunque éste sea heterogéneo. Este hecho indica que la célula aislada posee toda la maquinaria celular necesaria para generar las oscilaciones tras la disgregación del islote, sin embargo no es capaz de generar un patrón homogéneo como el que se muestra en la figura 29. El hecho de que no se encuentra acoplada al resto de células a través de las *gap junctions* induce a pensar que este canal no es necesario para la generación de las oscilaciones de calcio, pero sí para generar un patrón homogéneo y un correcto funcionamiento del islote.

El patrón de oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  mostrado en la célula  $\beta$  aislada coincide con la irregularidad y heterogeneidad de la actividad eléctrica observada cuando se expone el islote a bloqueantes de las *gap junctions*, en nuestro caso heptanol; la célula tampoco es capaz de generar un patrón homogéneo de actividad eléctrica debido a que las comunicaciones intercelulares permanecen bloqueadas, siendo imposible establecer una correcta comunicación con el resto de las células  $\beta$  del islote.

Modelos matemáticos basados en la hipótesis de que la actividad eléctrica está poco organizada en la célula  $\beta$  aislada predicen que las oscilaciones regulares del potencial de membrana emergen cuando las células están asociadas en clusters de tamaño suficiente (Sherman *et al.*, 1988; Sherman & Rinzel, 1991). Ya que los cambios en las oscilaciones de calcio intracelular dependen de los cambios en el potencial de membrana, se puede postular que también estarán influidas por el acoplamiento entre las células  $\beta$ .

Nuestros datos muestran que efectivamente a medida que el tamaño del cluster aumenta, las oscilaciones de calcio se organizan y muestran un patrón homogéneo, comparable con el mostrado en el islote entero. Este hecho indica que la comunicación

celular a través de las *gap* es fundamental para el funcionamiento del islote como un *sincitio*. Experimentos realizados con ratones mutantes para la conexina 36, presente en la célula  $\beta$  pancreática, demuestran que son incapaces de generar un patrón homogéneo de oscilaciones, corroborando la importancia de la comunicación celular (Sanchez-Andres *et al.*, 1988; Andreu *et al.*, 1997; Serre-Beinier *et al.*, 2000). Recientemente, Rocheleau *et al.* han conseguido que células deficientes en el canal de  $K^+_{ATP}$  sean funcionalmente activas y sean capaces de mostrar patrones oscilatorios homogéneos, debido a que las células vecinas, las cuales sí poseen canales de  $K^+_{ATP}$  funcionales son capaces de inducir a las primeras a mostrar dicho patrón, gracias a que permanecen acopladas a través de uniones *gap* (Rocheleau *et al.*, 2006).

Los registros realizados en islote entero muestran que éste se comporta como un *sincitio* en términos de  $Ca^{2+}$  intracelular, actividad eléctrica y secreción de insulina debido principalmente a las comunicaciones intercelulares vía *gap junctions*. Cabe destacar que el acoplamiento intercelular parece estar restringido a pequeños grupos celulares. Se ha demostrado que sólo las células  $\beta$  pancreáticas están acopladas mediante canales tipos *gap*, funcionando de manera coordinada dentro del islote y produciendo oscilaciones del potencial de membrana y calcio intracelular sincronas, a diferencia del resto de células que componen el islote ( $\alpha$  y  $\delta$ , secretoras de glucagón y somatostatina) las cuales poseen oscilaciones asíncronas entre ellas y entre las células  $\beta$  pancreáticas (Nadal *et al.*, 1999)

No se deben excluir otros mecanismos que sirvan para sincronizar la respuesta del islote. Trabajando sobre modelos se ha visto que la manipulación externa de potasio se traduce en la aparición del patrón oscilatorio y en la modulación de su frecuencia, demostrando que el potasio extracelular afecta significativamente a la actividad eléctrica. En este modelo, la difusión de potasio extracelular aumenta el acoplamiento eléctrico y sincroniza las células (Stokes & Rinzel, 1993). Otros mediadores de la sincronización de las señales en el islote propuestos han sido el ATP e incluso el óxido nítrico o el  $IP_3$

(Grapengiesser *et al.*, 1999; Calabrese *et al.*, 2003), (Boitano *et al.*, 1992) aunque el principal factor para la sincronización sigue siendo la comunicación vía *gap junction*.

Por todo lo expuesto anteriormente las células  $\beta$  pancreáticas se comportan como un *sincitio* en términos de actividad eléctrica y calcio intracelular, mostrando un patrón homogéneo de oscilación. Este comportamiento es una propiedad emergente de un grupo de células acopladas eléctricamente en donde la célula  $\beta$  aislada necesita del apropiado *feedback* de las células vecinas para exhibir el patrón oscilatorio.. Este hecho posee un claro papel fisiológico; la señal coordinada dentro del islote podría solucionar problemas derivados de la heterogeneidad de la secreción de insulina de células individuales, resultando en una secreción mucho más energética.

#### **4.1.3. El acoplamiento celular es necesario para la aparición de la potenciación en la célula $\beta$ pancreática.**

Los experimentos realizados previamente por nuestro grupo de investigación (Pomares, 2001) han demostrado la existencia de potenciación de la respuesta eléctrica en la célula  $\beta$  pancreática. Utilizando el protocolo mostrado en la figura 37 mediante el cual se mimetiza la activación vagal que se produce durante la fase cefálica de la digestión, se puede observar un aumento de la respuesta a los pulsos de glucosa después del tratamiento con el agonista muscarínico (figura 39).

El incremento en el tamaño de la onda de despolarización implica un incremento en la respuesta del sistema a un estímulo que es idéntico antes y después del tratamiento con carbacol, que además debe traducirse en un incremento en la secreción de insulina, puesto que se producen más espigas de calcio para el mismo estímulo.

Los resultados obtenidos anteriormente demuestran que la respuesta de la célula  $\beta$  no es fija, si no que es modificable temporalmente por el efecto de la coincidencia temporal de carbacol y glucosa. Es necesario la existencia de una ventana temporal en donde la glucosa y el carbacol coincidan para producir dicho aumento de actividad eléctrica tras la aplicación del estímulo.

La potenciación de la actividad eléctrica de la célula  $\beta$  implica que hay dos vías que transportan la información y que ambas han tenido el nivel suficiente de coincidencia temporal como para producir una asociación. Se ha postulado que debe existir algún tipo de interacción entre la vía del carbacol y la glucólisis.

El principal efecto de la glucólisis es la producción de ATP, con lo que cabe pensar que el mecanismo afectado por esta vía es el canal  $K^+_{ATP}$ . La producción de ATP produce el cierre de dichos canales, con lo que se produce una despolarización de la membrana y la entrada de calcio al interior celular.

Parece ser que la coincidencia del estado despolarizado, junto con la acción del carbacol sea un mecanismo por el cual se produzca la potenciación en la respuesta eléctrica de la célula  $\beta$ , aunque no se pueden descartar otros mecanismos que se derivan de la acción del cierre de los canales  $K^+_{ATP}$ , como puede ser el aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular o bien la activación de la PKC a través de la vía del carbacol (Pomares, 2001)

..

Otro de los mecanismos de acción del carbacol, además del vaciado de los depósitos, es la activación de la PKC a través de la DAG (Jones *et al.*, 1991), mostrado en la figura 7. por tanto, cabría esperar que si la liberación del calcio desde depósitos intracelulares no es suficiente para producir la potenciación, la activación de la PKC fuesen, junto con la entrada de calcio extracelular, los factores necesarios para la potenciación de la actividad eléctrica de la célula  $\beta$ . Sin embargo no está claro la

participación de dicha proteína en la potenciación, puesto que aunque si se produce la inhibición de la PKC con estaurosporina no se observa el fenómeno de potenciación, tampoco es observable dicho fenómeno cuando se activa la PKC mediante el uso de ésteres de forbol (Pomares, 2001).

Un mecanismo propuesto para la aparición de la potenciación y aún no testado es el papel del acoplamiento celular. Lo anteriormente expuesto se produce en unas condiciones donde las comunicaciones intercelulares se mantienen funcionales. No obstante el posible bloqueo de dicha comunicación mediante el uso de bloqueantes de las *gap junctions* podría impedir la aparición del fenómeno de potenciación, describiendo el fenómeno como una situación compleja en donde además de intervenir todos los factores anteriores, fuera imprescindible una cooperación entre células a través de la comunicación vía *gap*. La aplicación del bloqueante, en nuestro caso heptanol, se producía previo a la aplicación del estímulo con carbacol, según el protocolo expuesto en la figura 40. A concentraciones de 1 mM heptanol en donde la actividad oscilatoria está presente pero se impide la propagación de las espigas generadas en las células vecinas debido al cierre parcial de las uniones *gap*, se puede observar la aparición del fenómeno de potenciación (figura 41). En cambio, a concentraciones superiores de heptanol donde el bloqueo es mayor, dicho fenómeno no es apreciable, como demuestra los datos de cuantificación expuestos en esta tesis (figura 44). Se podría pensar que el heptanol a estas concentraciones impide que el carbacol produzca su efecto. Sin embargo, se puede observar que aún aplicando 3 mM heptanol y permaneciendo la célula hiperpolarizada, al aplicar carbacol se observa una ligera despolarización, con lo que se puede pensar que la acción del carbacol no está bloqueada por el heptanol a estas concentraciones, puesto que la despolarización de la membrana es debido a que el agente muscarínico está ejerciendo su efecto (figura 43).

Varias hipótesis se pueden barajar para explicar que no se produzca la potenciación cuando las células se encuentran desacopladas.

Cuando una célula se encuentra aislada eléctricamente del resto presenta un estado silente e hiperpolarizado y no es capaz de generar el patrón oscilatorio eléctrico típico del islote. Es este estado uno de los posibles efectos de que no se produzca el fenómeno de potenciación, puesto que como se ha discutido anteriormente, es necesario la coincidencia de un estado de despolarización de la membrana para observar dicho fenómeno. Un hecho secundario se deriva de este efecto, y es que si la célula permanece aislada, hiperpolarizada, se impide la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior celular, debido a la inactivación de los canales de calcio dependientes de voltaje. Este hecho, junto con el bloqueo de las uniones *gap* impediría la propagación de este ión entre las células, pudiendo ser una de las causas por las cuales no se observa el fenómeno de potenciación. Además, al estar las comunicaciones intercelulares alteradas, se impide la propagación de otras moléculas posiblemente implicadas en la potenciación, como pudiera ser el  $\text{IP}_3$ .

Aunque la implicación de la PKC no permanece clara, se sugiere la participación de alguna molécula intracelular difusible a través de las *gap* y activada por esta quinasa, que permanece activa aunque eliminemos el estímulo del medio. Si se impide el paso de dicha molécula con el uso de heptanol, se está impidiendo la aparición de la potenciación.

Por lo tanto, el fenómeno de potenciación en la célula  $\beta$  pancreática es un mecanismo complejo en donde convergen varias vías de acción para producir un aumento en la sensibilidad del sistema. Además de todos los mecanismos propuestos y descritos anteriormente por nuestro grupo de investigación y que pueden estar implicados en la aparición de dicho fenómeno, no se pudo descartar que el acoplamiento celular sea necesario para que se produzca la potenciación, a la vista de los resultados expuestos en esta tesis.

## 4.2. CONTEXTO FISIOLÓGICO

La investigación científica tiene tendencia al reduccionismo por cuanto es consustancial al método el análisis de una variable que evoluciona mientras se intenta que el resto se mantengan tan estables como sea posible. Esto se consigue con mayor facilidad utilizando modelos simples o simplificados al máximo en los que el aislamiento de variables es más factible.

Prueba de la validez de esta aproximación son los grandes avances realizados en fisiología celular. Pero el objetivo de la fisiología es tanto el avance del conocimiento de la función celular como la de los sistemas. Sin embargo, los sistemas incorporan mayor complicación tanto por la dificultad de aislar un número mayor de variables como por el hecho de que se incorporan variables que no existen en el nivel celular. Estas últimas son conceptualizables como influencias tanto directas y específicas como humorales o inespecíficas que pueden aportar instrucciones a determinadas células diana, control por retroalimentación, etc. Es difícil establecer una predicción sobre las implicaciones de las interacciones celulares. Puede haber colectivos que funcionen por mera aposición siendo el comportamiento de conjunto la suma de las partes pero puede darse la emergencia de propiedades no esperables desde el conocimiento de las partes.

La primera posibilidad simplificaría el análisis de los sistemas pero parece razonable esperar que, con frecuencia, se presente la segunda. Durante la segunda mitad del siglo XX se ha desarrollado con cierta popularidad el campo de los denominados “sistemas complejos” o “ciencia-no-lineal” que viene pretendiendo detectar rasgos comunes en el comportamiento de sistemas diferentes mediante la utilización de métodos matemáticos de detección de procesos no lineales. La hipótesis subyacente es que procesos similares soportarán este tipo de análisis dando información sobre las dinámicas subyacentes.

A pesar de las expectativas de estas aproximaciones los rendimientos han sido bajos. Ello puede explicarse como consecuencia de que una aproximación *top-bottom* (de arriba abajo) de este estilo trivializa la existencia de mecanismos intrínsecos a cada sistema que condicionan una heterogeneidad no incorporada al análisis. En el extremo, puede considerarse que la supuesta complejidad deriva más de la ignorancia sobre los sistemas que de la complicación intrínsecamente contenida en los mismos lo que orientaría en la dirección de perfeccionar el análisis reduccionista.

En el presente trabajo se aborda la vía intermedia de intentar explorar la evolución de variables como el resultado del agrupamiento celular en la dirección de tratar de caracterizar propiedades que aparecen o que se modifican como consecuencia del mismo. Es una vía que entraña dificultades pero que viene siendo usada en nuestro grupo con resultados razonables en sistemas biológicos (Menéndez de la Prida & Sánchez-Andrés, 1999; Bolea *et al.* 2006) y con modelos matemáticos (Louis *et al.*, 2002). Como aproximación *top to bottom* (de abajo arriba) entendemos que es más lenta que la más frecuentemente usada para abordar el sistema en su totalidad pero puede permitir abordar el concepto de propiedades específicas de grupos celulares desde el que tratar de reconstruir la funcionalidad del sistema.

Con esta intención en el presente trabajo se demostrado que las células aisladas presentan un patrón de oscilación muy diferente al mostrado en condiciones fisiológicas por el sistema, en donde las células  $\beta$  pancreáticas se encuentran interaccionando a través de comunicaciones intercelulares. El uso de disruptores de las *gap-junctions* en el islote Langerhans ha demostrado que la respuesta oscilatoria y la potenciación mostrada en dicho sistema puede ser modificada en función del grado de acoplamiento celular. Así pues, las células aisladas no son capaces de mostrar el patrón oscilatorio típico del islote, hecho demostrado también en esta tesis mediante los experimentos de calcio intracelular. Las

oscilaciones suelen ser más regulares cuando las células se organizan y establecen comunicaciones entre sí.

Con todo ello, se podría decir que este comportamiento es una propiedad emergente de un grupo de células acopladas eléctricamente en donde la célula aislada necesitaría de la comunicación con otras células vecinas para exhibir el patrón oscilatorio.

Nuestros datos aportan evidencias del papel de las uniones *gap* en la generación de patrones de descarga sincronos, que se traducen en un correcto funcionamiento del islote y una correcta secreción de insulina. Cuando estos patrones se disrumpen, dan lugar a enfermedad, como es el caso de la diabetes. Estos resultados pueden contribuir a la comprensión de la fisiopatología de las enfermedades relacionadas, como la epilepsia, y podría abrir puertas al uso de nuevas técnicas terapéuticas.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## **5. CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

1. Existe una sincronía entre las células  $\beta$  pancreáticas que se manifiesta en el comportamiento global en forma de *sincitio* en términos de actividad eléctrica y calcio intracelular.
2. Las espigas de calcio generadas en células vecinas se propagan a través de las uniones *gap* hasta la célula registrada, traducándose este fenómeno en la aparición de un patrón heterogéneo de población.
3. Las espigas de calcio de mayor amplitud pertenecen a la propia célula registrada, mientras que las de menor amplitud proceden de las células vecinas.
4. La aplicación de bloqueantes de las *gap junctions* permite observar una homogeneización de la población de espigas, impidiendo la propagación de las espigas generadas en otras células.
5. Concentraciones elevadas de bloqueante aplicadas al islote entero provocan que la célula  $\beta$  muestre un patrón de actividad similar a la célula aislada.
6. Es necesaria la cooperación celular a través de las *gap junctions* para la aparición de la actividad oscilatoria.
7. Existe una concordancia con los modelos matemáticos que predicen un aumento de la regularidad de las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular cuando las células  $\beta$  se asocian en clusters de tamaño suficiente.



8. La respuesta eléctrica de la célula  $\beta$  a la glucosa no es fija, sino que es modificable por la coincidencia temporal de glucosa y carbacol.
9. El aumento o potenciación de la respuesta eléctrica de la célula  $\beta$  constituye un incremento de la sensibilidad del sistema frente a un mismo estímulo.
10. La potenciación es un mecanismo complejo donde es fundamental mantener la comunicación intercelular para que se exprese.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## **6. BIBLIOGRAFÍA**

- ANDREU E (1997). "El acoplamiento intercelular entre las células  $\beta$  del islote pancreático de ratón.: estudio electrofisiológico y computacional". *Tesis Doctoral*.
- ANDREU E, SORIA B & SANCHEZ-ANDRES JV. (1997). Oscillation of gap junction electrical coupling in the mouse pancreatic islets of Langerhans. *J Physiol* **498 (Pt 3)**, 753-761.
- ANTUNES CM, SALGADO AP, ROSARIO LM & SANTOS RM. (2000). Differential patterns of glucose-induced electrical activity and intracellular calcium responses in single mouse and rat pancreatic islets. *Diabetes* **49**, 2028-2038.
- ASHCROFT FM, HARRISON DE & ASHCROFT SJ. (1984). Glucose induces closure of singlepotassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells. *Nature* **312**, 446-448.
- ASHCROFT FM & RORSMAN P. (1989). Electrophysiology of the pancreatic beta-cell. *Prog Biophys Mol Biol* **54**, 87-143.
- ASHCROFT FM & RORSMAN P. (1990). ATP-sensitive  $K^+$  channels: a link between B-cell metabolism and insulin secretion. *Biochem Soc Trans* **18**, 109-111.
- ATWATER I, RIBALET B & ROJAS E. (1979). Mouse pancreatic beta-cells: tetraethylammonium blockage of the potassium permeability increase induced by depolarization. *J Physiol* **288**, 561-574.
- AXON GUIDE FOR ELECTROPHYSIOLOGY AND BIOPHYSICS LABORATORY TECHNIQUES. Axon Instruments, Inc. 1993
- BASTIDE B, HERVE JC, CRONIER L & DELEZE J. (1995). Rapid onset and calcium independence of the gap junction uncoupling induced by heptanol in cultured heart cells. *Pflugers Arch* **429**, 386-393.
- BERGGREN PO, ARKHAMMAR P, ISLAM MS, JUNTTI-BERGGREN L, KHAN A, KINDMARK H, KOHLER M, LARSSON K, LARSSON O, NILSSON T & ET AL. (1993). Regulation of cytoplasmic free  $Ca^{2+}$  in insulin-secreting cells. *Adv Exp Med Biol* **334**, 25-45.
- BERGSTEN P, GRAPENGIESSER E, GYLFE E, TENGHOLM A & HELLMAN B. (1994). Synchronous oscillations of cytoplasmic  $Ca^{2+}$  and insulin release in glucose-stimulated pancreatic islets. *J Biol Chem* **269**, 8749-8753.
- BERRIDGE MJ. (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* **361**, 315-325.
- BERTRAM R, PREVITE J, SHERMAN A, KINARD TA & SATIN LS. (2000). The phantom burster model for pancreatic beta-cells. *Biophys J* **79**, 2880-2892.

- BERTRAM R & SHERMAN A. (2000). Dynamical complexity and temporal plasticity in pancreatic beta-cells. *J Biosci* **25**, 197-209.
- BERTRAM R, SMOLEN P, SHERMAN A, MEARS D, ATWATER I, MARTIN F & SORIA B. (1995). A role for calcium release-activated current (CRAC) in cholinergic modulation of electrical activity in pancreatic beta-cells. *Biophys J* **68**, 2323-2332.
- BERTUZZI F, DAVALLI AM, NANO R, SOCCI C, CODAZZI F, FESCE R, DI CARLO V, POZZA G & GROHOVAZ F. (1999). Mechanisms of coordination of  $\text{Ca}^{2+}$  signals in pancreatic islet cells. *Diabetes* **48**, 1971-1978.
- BOITANO S, DIRKSEN ER & SANDERSON MJ. (1992). Intercellular propagation of calcium waves mediated by inositol trisphosphate. *Science* **258**, 292-295.
- BOLEA S, WU JY & SANCHEZ-ANDRÉS JV. (2006). Initiation and propagation of neural coactivation in the developing hippocampus. *J. Neurophysiol.* **95**, 552-561
- BOKVIST K, ELIASSON L, AMMALA C, RENSTROM E & RORSMAN P. (1995). Co-localization of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels and insulin-containing secretory granules and its significance for the initiation of exocytosis in mouse pancreatic B-cells. *Embo J* **14**, 50-57.
- BOKVIST K, HOLMQVIST M, GROMADA J & RORSMAN P. (2000). Compound exocytosis in voltage-clamped mouse pancreatic beta-cells revealed by carbon fibre amperometry. *Pflugers Arch* **439**, 634-645.
- BOKVIST K, RORSMAN P & SMITH PA. (1990). Block of ATP-regulated and  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels in mouse pancreatic beta-cells by external tetraethylammonium and quinine. *J Physiol* **423**, 327-342.
- CALABRESE A, ZHANG M, SERRE-BEINIER V, CATON D, MAS C, SATIN LS & MEDA P. (2003). Connexin 36 controls synchronization of  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations and insulin secretion in MIN6 cells. *Diabetes* **52**, 417-424.
- CHAROLLAIS A, GJINOVCI A, HUARTE J, BAUQUIS J, NADAL A, MARTIN F, ANDREU E, SANCHEZ-ANDRES JV, CALABRESE A, BOSCO D, SORIA B, WOLLHEIM CB, HERRERA PL & MEDA P. (2000). Junctional communication of pancreatic beta cells contributes to the control of insulin secretion and glucose tolerance. *J Clin Invest* **106**, 235-243.
- COOK DL & HALES CN. (1984). Intracellular ATP directly blocks  $\text{K}^{+}$  channels in pancreatic B-cells. *Nature* **311**, 271-273.
- DEAN PM & MATTHEWS EK. (1968). Electrical activity in pancreatic islet cells. *Nature* **219**, 389-390.

- DEUTSCH DE, WILLIAMS JA & YULE DI. (1995). Halothane and octanol block  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations in pancreatic acini by multiple mechanisms. *Am J Physiol* **269**, G779-788.
- DUNNE MJ & PETERSEN OH. (1986). Intracellular ADP activates  $\text{K}^{+}$  channels that are inhibited by ATP in an insulin-secreting cell line. *FEBS Lett* **208**, 59-62.
- ELRICK H, STIMMLER L, HLAD CJ, JR. & ARAI Y. (1964). Plasma Insulin Response To Oral And Intravenous Glucose Administration. *J Clin Endocrinol Metab* **24**, 1076-1082.
- GERICH JE, CHARLES MA & GRODSKY GM. (1976). Regulation of pancreatic insulin and glucagon secretion. *Annu Rev Physiol* **38**, 353-388.
- GOPEL S, KANNO T, BARG S, GALVANOVSKIS J & RORSMAN P. (1999). Voltage-gated and resting membrane currents recorded from B-cells in intact mouse pancreatic islets. *J Physiol* **521 Pt 3**, 717-728.
- GRAPENGIESSER E, GYLFE E & HELLMAN B. (1988). Glucose-induced oscillations of cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  in the pancreatic beta-cell. *Biochem Biophys Res Commun* **151**, 1299-1304.
- GRAPENGIESSER E, GYLFE E & HELLMAN B. (1999). Synchronization of glucose-induced  $\text{Ca}^{2+}$  transients in pancreatic beta-cells by a diffusible factor. *Biochem Biophys Res Commun* **254**, 436-439.
- GRYNKIEWICZ G, POENIE M & TSIEN RY. (1985). A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* **260**, 3440-3450.
- GYLFE E, GRAPENGIESSER E & HELLMAN B. (1991). Propagation of cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations in clusters of pancreatic beta-cells exposed to glucose. *Cell Calcium* **12**, 229-240.
- HELLMAN B, GYLFE E, GRAPENGIESSER E, LUND PE & BERTS A. (1992). Cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations in pancreatic beta-cells. *Biochim Biophys Acta* **1113**, 295-305.
- HENQUIN JC. (1990). Glucose-induced electrical activity in beta-cells. Feedback control of ATP-sensitive  $\text{K}^{+}$  channels by  $\text{Ca}^{2+}$ ? [corrected]. *Diabetes* **39**, 1457-1460.
- HENQUIN JC, GARCIA MC, BOZEM M, HERMANS MP & NENQUIN M. (1988). Muscarinic control of pancreatic B cell function involves sodium-dependent depolarization and calcium influx. *Endocrinology* **122**, 2134-2142.

HENQUIN JC & MEISSNER HP. (1982). Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on  $^{86}\text{Rb}^+$  fluxes and membrane potential in pancreatic B cells. *Biochem Pharmacol* **31**, 1407-1415.

JOHNSON JH, NEWGARD CB, MILBURN JL, LODISH HF & THORENS B. (1990). The high  $K_m$  glucose transporter of islets of Langerhans is functionally similar to the low affinity transporter of liver and has an identical primary sequence. *J Biol Chem* **265**, 6548-6551.

JONES PM, PERSAUD SJ & HOWELL SL. (1991). Protein kinase C and the regulation of insulin secretion from pancreatic B cells. *J Mol Endocrinol* **6**, 121-127.

JONKERS FC, JONAS JC, GILON P & HENQUIN JC. (1999). Influence of cell number on the characteristics and synchrony of  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations in clusters of mouse pancreatic islet cells. *J Physiol* **520 Pt 3**, 839-849.

KAJINUMA H, KANETO A, KUZUYA T & NAKAO K. (1968). Effects of methacholine on insulin secretion in man. *J Clin Endocrinol Metab* **28**, 1384-1388.

KANETO A, KOSAKA K & NAKAO K. (1967). Effects of stimulation of the vagus nerve on insulin secretion. *Endocrinology* **80**, 530-536.

KINARD TA, DE VRIES G, SHERMAN A & SATIN LS. (1999). Modulation of the bursting properties of single mouse pancreatic beta-cells by artificial conductances. *Biophys J* **76**, 1423-1435.

KUKULJAN M, GONCALVES AA & ATWATER I. (1991). Charybdotoxin-sensitive  $\text{K}(\text{Ca})$  channel is not involved in glucose-induced electrical activity in pancreatic beta-cells. *J Membr Biol* **119**, 187-195.

KUMAR NM & GILULA NB. (1996). The gap junction communication channel. *Cell* **84**, 381-388.

LARSSON O, KINDMARK H, BRANDSTROM R, FREDHOLM B & BERGGREN PO. (1996). Oscillations in  $\text{KATP}$  channel activity promote oscillations in cytoplasmic free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in the pancreatic beta cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 5161-5165.

LEBRUN P & ATWATER I. (1985). Effects of the calcium channel agonist, BAY K 8644, on electrical activity in mouse pancreatic B-cells. *Biophys J* **48**, 919-930.

LERNMARK A. (1974). The preparation of, and studies on, free cell suspensions from mouse pancreatic islets. *Diabetologia* **10**, 431-438.

- LOUIS E, DEGLI ESPOSTI BOSCHI C, ORTEGA G, ANDREU E, FERNANDEZ E & SANCHEZ-ANDRES JV. (2002). Effects of fluctuations on electrical properties of gap-junction connected cells in the turtle retina. *Neurosci. Lett.* **323**, 21-24
- MANOR Y, RINZEL J, SEGEV I & YAROM Y. (1997). Low-amplitude oscillations in the inferior olive: a model based on electrical coupling of neurons with heterogeneous channel densities. *J Neurophysiol* **77**, 2736-2752.
- MARTIN F, RIBAS J & SORIA B. (1997). Cytosolic Ca<sup>2+</sup> gradients in pancreatic islet-cells stimulated by glucose and carbachol. *Biochem Biophys Res Commun* **235**, 465-468.
- MATCHKOV VV, RAHMAN A, PENG H, NILSSON H & AALKJAER C. (2004). Junctional and nonjunctional effects of heptanol and glycyrrhetic acid derivatives in rat mesenteric small arteries. *Br J Pharmacol* **142**, 961-972.
- MEDA P. (1996). The role of gap junction membrane channels in secretion and hormonal action. *J Bioenerg Biomembr* **28**, 369-377.
- MEDA P, BRUZZONE R, KNODEL S & ORCI L. (1986). Blockage of cell-to-cell communication within pancreatic acini is associated with increased basal release of amylase. *J Cell Biol* **103**, 475-483.
- MEISSNER HP. (1976). Electrophysiological evidence for coupling between beta cells of pancreatic islets. *Nature* **262**, 502-504.
- MEISSNER HP, HENQUIN JC & PREISSLER M. (1978). Potassium dependence of the membrane potential of pancreatic B-cells. *FEBS Lett* **94**, 87-89.
- MENENDEZ DE LA PRIDA L & SANCHEZ-ANDRES JV (1999). Nonlinear frequency-dependent synchronization in the developing hippocampus. *J. Neurophysiol.* **82**, 202-208.
- MILLER RE. (1981). Pancreatic neuroendocrinology: peripheral neural mechanisms in the regulation of the Islets of Langerhans. *Endocr Rev* **2**, 471-494.
- MORENO AP, BERTHOUD VM, PEREZ-PALACIOS G & PEREZ-ARMENDARIZ EM. (2005). Biophysical evidence that connexin-36 forms functional gap junction channels between pancreatic mouse beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **288**, E948-956.
- NADAL A, QUESADA I & SORIA B. (1999). Homologous and heterologous asynchronicity between identified alpha-, beta- and delta-cells within intact islets of Langerhans in the mouse. *J Physiol* **517 (Pt 1)**, 85-93.

ORCI L, UNGER RH & RENOLD AE. (1973). Structural coupling between pancreatic islet cells. In *Experientia*, vol. 29, pp. 1015-1018.

PEREZ-ARMENDARIZ E & ATWATER I. (1986). Glucose-evoked changes in  $[K^+]$  and  $[Ca^{2+}]$  in the intercellular spaces of the mouse islet of Langerhans. In *Adv Exp Med Biol*, vol. 211, pp. 31-51.

PEREZ-ARMENDARIZ M, ROY C, SPRAY DC & BENNETT MV. (1991). Biophysical properties of gap junctions between freshly dispersed pairs of mouse pancreatic beta cells. *Biophys J* **59**, 76-92.

PERSAUD SJ, JONES PM & HOWELL SL. (1993). Staurosporine inhibits protein kinases activated by  $Ca^{2+}$  and cyclic AMP in addition to inhibiting protein kinase C in rat islets of Langerhans. *Mol Cell Endocrinol* **94**, 55-60.

PLANT TD. (1988). Properties and calcium-dependent inactivation of calcium currents in cultured mouse pancreatic B-cells. *J Physiol* **404**, 731-747.

POMARES R (2001) "Aprendizaje asociativo en la célula  $\beta$  pancreática. Un modelo de memoria no neural". *Tesis Doctoral*.

PORTE D, JR., SMITH PH & ENSINCK JW. (1976). Neurohumoral regulation of the pancreatic islet A and B cells. *Metabolism* **25**, 1453-1456.

PRENTKI M & MATSCHINSKY FM. (1987).  $Ca^{2+}$ , cAMP, and phospholipid-derived messengers in coupling mechanisms of insulin secretion. *Physiol Rev* **67**, 1185-1248.

PURVES RD (1981). Microelectrode methods for intracellular recordings and iontophoresis. *Academic Press*.

RADKE R & STACH W. (1986). [Bisynaptic connection in an insulin-producing B-cell]. *J Hirnforsch* **27**, 537-538.

RAVIER MA, GULDENAGEL M, CHAROLLAIS A, GJINOVCI A, CAILLE D, SOHL G, WOLLHEIM CB, WILLECKE K, HENQUIN JC & MEDA P. (2005). Loss of connexin36 channels alters beta-cell coupling, islet synchronization of glucose-induced  $Ca^{2+}$  and insulin oscillations, and basal insulin release. *Diabetes* **54**, 1798-1807.

RIPOLL C, MARTIN F, MANUEL ROVIRA J, PINTOR J, MIRAS-PORTUGAL MT & SORIA B. (1996). Diadenosine polyphosphates. A novel class of glucose-induced intracellular messengers in the pancreatic beta-cell. *Diabetes* **45**, 1431-1434.

ROCHELEAU JV, REMEDI MS, GRANADA B, HEAD WS, KOSTER JC, NICHOLS CG & PISTON DW. (2006). Critical role of gap junction coupled KATP channel activity for regulated insulin secretion. *PLoS Biol* **4**, e26.

RORSMAN P, ASHCROFT FM & TRUBE G. (1988). Single Ca channel currents in mouse pancreatic B-cells. *Pflugers Arch* **412**, 597-603.

RORSMAN P & TRUBE G. (1986). Calcium and delayed potassium currents in mouse pancreatic beta-cells under voltage-clamp conditions. *J Physiol* **374**, 531-550.

ROSARIO LM, ATWATER I & SCOTT AM. (1986). Pulsatile insulin release and electrical activity from single ob/ob mouse islets of Langerhans. *Adv Exp Med Biol* **211**, 413-425.

SAEZ JC, CONNOR JA, SPRAY DC & BENNETT MV. (1989). Hepatocyte gap junctions are permeable to the second messenger, inositol 1,4,5-trisphosphate, and to calcium ions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 2708-2712.

SALOMON D & MEDA P. (1986). Heterogeneity and contact-dependent regulation of hormone secretion by individual B cells. *Exp Cell Res* **162**, 507-520.

SANCHEZ-ANDRES JV, NADAL A, MARTIN F & SORIA B (1994). Sequential effects of muscarinic agonist on glucose induced electrical activity and cytosolic  $Ca^{2+}$  in the pancreatic B-cell. In *Frontiers in B-cell research*. Eds. Flatt, P. and Lauren S., Smith-Gordon and Co. Ltd., London.

SANCHEZ-ANDRES JV, GOMIS A & VALDEOLMILLOS M. (1995). The electrical activity of mouse pancreatic beta-cells recorded in vivo shows glucose-dependent oscillations. *J Physiol* **486 (Pt 1)**, 223-228.

SANTOS RM, ROSARIO LM, NADAL A, GARCIA-SANCHO J, SORIA B & VALDEOLMILLOS M. (1991). Widespread synchronous  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations due to bursting electrical activity in single pancreatic islets. *Pflugers Arch* **418**, 417-422.

SERRE-BEINIER V, LE GURUN S, BELLUARDO N, TROVATO-SALINARO A, CHAROLLAIS A, HAEFLIGER JA, CONDORELLI DF & MEDA P. (2000). Cx36 preferentially connects beta-cells within pancreatic islets. *Diabetes* **49**, 727-734.

SHARP GW. (1979). The adenylate cyclase-cyclic AMP system in islets of Langerhans and its role in the control of insulin release. *Diabetologia* **16**, 287-296.

SHARP R, CULBERT S, COOK J, JENNINGS A & BURR IM. (1974). Cholinergic modification of glucose-induced biphasic insulin release in vitro. *J Clin Invest* **53**, 710-716.

SHERMAN A & RINZEL J. (1991). Model for synchronization of pancreatic beta-cells by gap junction coupling. *Biophys J* **59**, 547-559.

SHERMAN A & RINZEL J. (1992). Rhythmogenic effects of weak electrotonic coupling in neuronal models. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 2471-2474.

SHERMAN A, RINZEL J & KEIZER J. (1988). Emergence of organized bursting in clusters of pancreatic beta-cells by channel sharing. *Biophys J* **54**, 411-425.

SMITH P, MILLARD PJ, FEWTRELL CM & ASHCROFT FM. (1997). Heterogeneity of beta-cell  $\text{Ca}^{2+}$  responses to glucose. *Adv Exp Med Biol* **426**, 253-257.

SMITH PA, ASHCROFT FM & RORSMAN P. (1990). Simultaneous recordings of glucose dependent electrical activity and ATP-regulated  $\text{K}^{+}$ -currents in isolated mouse pancreatic beta-cells. *FEBS Lett* **261**, 187-190.

SMITH PH & PORTE D, JR. (1976). Neuropharmacology of the pancreatic islets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **16**, 269-285.

SMOLEN P, RINZEL J & SHERMAN A. (1993). Why pancreatic islets burst but single beta cells do not. The heterogeneity hypothesis. *Biophys J* **64**, 1668-1680.

SORIA B & FERRER R. (1986). Graded spike electrogenesis in mouse pancreatic beta-cells. *Adv Exp Med Biol* **211**, 235-246.

SORIA B, MARTIN F, ANDREU E, SANCHEZ-ANDRES JV, NACHER V & MONTANA E. (1996). Diminished fraction of blockable ATP-sensitive  $\text{K}^{+}$  channels in islets transplanted into diabetic mice. *Diabetes* **45**, 1755-1760.

SORIA B (1998). Fundamentos de un nuevo sistema bioinspirado para la infusión de insulina. *Av. diabetol.* **14**, 19-25.

SQUIRES PE, HAUGE-EVANS AC, PERSAUD SJ & JONES PM. (2000). Synchronization of  $\text{Ca}^{2+}$ -signals within insulin-secreting pseudoislets: effects of gap-junctional uncouplers. *Cell Calcium* **27**, 287-296.

STAHL M. (1963). [Electron Microscope Studies On The Vegetative Innervation Of The Pancreas.]. *Z Mikrosk Anat Forsch* **70**, 62-102.

STOKES CL & RINZEL J. (1993). Diffusion of extracellular  $\text{K}^{+}$  can synchronize bursting oscillations in a model islet of Langerhans. *Biophys J* **65**, 597-607.

STURGESS NC, ASHFORD ML, COOK DL & HALES CN. (1985). The sulphonylurea receptor may be an ATP-sensitive potassium channel. *Lancet* **2**, 474-475.

TABCHARANI JA & MISLER S. (1989).  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channel in rat pancreatic islet B cells: permeation, gating and blockade by cations. *Biochim Biophys Acta* **982**, 62-72.

TAKEMURA H, HUGHES AR, THASTRUP O & PUTNEY JW, JR. (1989). Activation of calcium entry by the tumor promoter thapsigargin in parotid acinar cells. Evidence that an intracellular calcium pool and not an inositol phosphate regulates calcium fluxes at the plasma membrane. *J Biol Chem* **264**, 12266-12271.

TAKENS-KWAK BR, JONGSMA HJ, ROOK MB & VAN GINNEKEN AC. (1992). Mechanism of heptanol-induced uncoupling of cardiac gap junctions: a perforated patch-clamp study. *Am J Physiol* **262**, C1531-1538.

THELER JM, MOLLARD P, GUERINEAU N, VACHER P, PRALONG WF, SCHLEGEL W & WOLLHEIM CB. (1992). Video imaging of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  in pancreatic beta-cells stimulated by glucose, carbachol, and ATP. *J Biol Chem* **267**, 18110-18117.

VALDEOLMILLOS M, GOMIS A & SANCHEZ-ANDRES JV. (1996). In vivo synchronous membrane potential oscillations in mouse pancreatic beta-cells: lack of co-ordination between islets. *J Physiol* **493 (Pt 1)**, 9-18.

VALDEOLMILLOS M, NADAL A, SORIA B & GARCIA-SANCHO J. (1993). Fluorescence digital image analysis of glucose-induced  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oscillations in mouse pancreatic islets of Langerhans. *Diabetes* **42**, 1210-1214.

VALDEOLMILLOS M, SANTOS RM, CONTRERAS D, SORIA B & ROSARIO LM. (1989). Glucose-induced oscillations of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration resembling bursting electrical activity in single mouse islets of Langerhans. *FEBS Lett* **259**, 19-23.

VOZZI C, ULLRICH S, CHAROLLAIS A, PHILIPPE J, ORCI L & MEDA P. (1995). Adequate connexin-mediated coupling is required for proper insulin production. *J Cell Biol* **131**, 1561-1572.

WOLLHEIM CB & POZZAN T. (1984). Correlation between cytosolic free  $\text{Ca}^{2+}$  and insulin release in an insulin-secreting cell line. *J Biol Chem* **259**, 2262-2267.

WOODS SC, ALEXANDER KR & PORTE D, JR. (1972). Conditioned insulin secretion and hypoglycemia following repeated injections of tolbutamide in rats. *Endocrinology* **90**, 227-231.

WOODS SC & PORTE D, JR. (1974). Neural control of the endocrine pancreas. *Physiol Rev* **54**, 596-619.

WOODS SC (1991). The eating paradox: how we tolerate food. *Psychological Review* **98**, 488-505.

WOODS SC (1996). Insulin and the brain: a mutual dependency. *Progr. Psychobiol. Psychol.* **16**, 53-81

ZHANG M, GOFORTH P, BERTRAM R, SHERMAN A & SATIN L. (2003). The  $Ca^{2+}$  dynamics of isolated mouse beta-cells and islets: implications for mathematical models. *Biophys J* **84**, 2852-2870.