



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**INVESTIGACIÓN DE LA POSIBLE EXPRESIÓN DE LA CONEXINA 30.2 EN LAS  
CÉLULAS BETA PANCREÁTICAS DE RATÓN**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**CRISTINA CORONEL CRUZ**

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ELIA MARTHA PÉREZ ARMENDARIZ  
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA CRISTINA FERNÁNDEZ MEJÍA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
DRA. LAURA LEONILA ESCOBAR PÉREZ  
FACULTAD DE MEDICINA

**MÉXICO, D.F., NOVIEMBRE DE 2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**INVESTIGACIÓN DE LA POSIBLE EXPRESIÓN DE LA CONEXINA 30.2 EN LAS  
CÉLULAS BETA PANCREÁTICAS DE RATÓN**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**CRISTINA CORONEL CRUZ**

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ELIA MARTHA PÉREZ ARMENDARIZ  
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA CRISTINA FERNÁNDEZ MEJÍA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
DRA. LAURA LEONILA ESCOBAR PÉREZ  
FACULTAD DE MEDICINA

**MÉXICO, D.F., NOVIEMBRE DE 2013**



**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina, en su sesión ordinaria del día 12 de agosto de 2013, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **CORONEL CRUZ CRISTINA** con número de cuenta 503005308, con la tesis titulada **"INVESTIGACIÓN DE LA POSIBLE EXPRESIÓN DE LA CONEXINA 30.2 EN LAS CÉLULAS BETA PANCREATICAS DE RATÓN"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. ELIA MARTHA PÉREZ ARMENDARIZ**:

Presidente: DR. MARCO ANTONIO JUÁREZ OROPEZA  
Vocal: DRA. ERIKA PATRICIA RENDÓN HUERTA  
Secretario: DRA. MARÍA CRISTINA FERNÁNDEZ MEJÍA  
Suplente: DRA. CRISTINA REVILLA MONSALVE  
Suplente: DR. ARMANDO TOVAR PALACIO

El Comité Académico, aprobó que la integración del jurado se realizara a solicitud de la alumna, **con cinco sinodales**, con base en lo establecido en el Artículo 31 y acogiéndose al artículo **QUINTO TRANSITORIO**, del Reglamento General de Estudios de Posgrado vigente.

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 18 de octubre de 2013

**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, UNAM, por haberme alojado como estudiante de doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por haberme distinguido como becaria durante la realización del presente trabajo (CVU/becaria: 42623/202526).

A la Dra. E. Martha Pérez Armendariz, Directora de tesis, por asesorar este proyecto.

A los donativos otorgados a la Dra. E. Martha Pérez Armendariz: DGAPA IN231011 y CONACyT 51243Q, que financiaron este proyecto.

A la Dra. Ma. Cristina Fernández Mejía y la Dra. Laura Leonila Escobar Pérez, por formar parte de mi comité tutorial, por sus sabios consejos y aportaciones siempre positivas para la realización de esta tesis.

## **AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL**

**Agradezco su valiosa colaboración y aportaciones científicas para la realización de esta tesis a:**

Dr. Marco Tulio González Martínez<sup>†</sup>, Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, UNAM.

Dra. María del Rosario López Vancell, Unidad de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM.

Dr. Jaime Berumen Campos, Jefe de la Unidad de Medicina Genómica, Facultad de Medicina, UNAM y Hospital General de México.

Dra. Yolanda López Vidal, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM.

Dr. Andrés Castell Elliu, Jefe del Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM.

Dr. Angel Zarain Herzberg, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM.

Dra. Nimbe Torres y Torres y Dr. Armando Tovar Palacio, Departamento de Fisiología de la Nutrición, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán.

Dr. Ignacio González Sánchez, Departamento de Biología, Facultad de Química/ Departamento de Productos Naturales, Instituto de Química, UNAM.

A la Bióloga Beatriz Hernández Tellez, Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM, por su valioso apoyo técnico para la conclusión de este trabajo.

A María de Lourdes Cruz Miguel, del laboratorio de Sinapsis Eléctricas, Unidad de Medicina Experimental, UNAM, por su instrucción en el aislamiento de islotes de Langerhans.

A los Doctores Enrique Pinzón Estrada, Dr. Ismael Torres Saldaña y Dr. Victor Manuel Salgado, Bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM, por el cuidado de los ratones CD1.

Gracias a la Dra. Ana María Espinosa García, de la Unidad de Medicina Genómica, Hospital General de México, por compartir sus conocimientos y experiencia en la metodología de PCR de tiempo real y por brindarme su amistad.

Gracias a la Dra. Karina Jiménez Durán, de la USAI, Facultad de Química, UNAM, por su entusiasmo al tomar las mejores imágenes de microscopia confocal, por alentarme en los momentos difíciles y por su amistad.

Gracias a la Dra. Ana María Castro, del Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, UNAM, por sus sabios consejos y su valiosa amistad.

Mil Gracias a la Dra. Nayeli Rodríguez Fuentes, por su orientación de la Revista donde se publicó este trabajo.

Gracias también a mis compañeros y amigos, quienes hicieron feliz mi estancia en el laboratorio: Lulú, Alma, Marcelino, Viviana, Rosaurora, María, Emanuel, Alejandro, César, Elizabeth, Jaqueline, Claudia, Patricia, Doña Mago, Lidia, Linda, Gerardo del Toro, Alina, Ernesto, Eva, Rocío, Sandra, Daniela, Diana, Karla, Edith y Alberto.

## **DEDICATORIA**

*Esta tesis la dedico con amor a Sofía, Diego e Ignacio, mis grandes amores.*

*A mis Padres, por su amor y apoyo incondicional durante este largo tiempo.*

*A mis hermanos y abuelitos, por su amor y comprensión.*

*A mis cuñadas Clemencia y Virginia, por su cariño, por alentarme siempre a continuar y su gran apoyo.*

# ÍNDICE

|   |     |
|---|-----|
| ABREVIATURAS .....  | I   |
| RESUMEN .....   | III |
| ABSTRACT .....  | IV  |
| I. INTRODUCCIÓN .....   | 1   |
| A. PÁNCREAS E ISLOTES DE LANGERHANS   |     |
| A.1 Generalidades del páncreas .....  | 1   |
| A.2 Arreglo estructural y composición de los islotes de Langerhans. ....                              | 2   |
| A.3 La vasculatura de los islotes de Langerhans .....   | 3   |
| B. SECRECIÓN DE INSULINA Y SUS ACCIONES   |     |
| B.1 Homeostasis de la glucosa .....   | 6   |
| B.2 Secreción de insulina .....   | 10  |
| B.3 Acople estímulo-secreción de insulina .....   | 11  |
| B.4 Actividad eléctrica de las células beta pancreáticas .....  | 12  |
| B.5 Acciones de la insulina .....   | 14  |
| C. CONEXINAS Y CANALES DE UNIÓN COMUNICANTE   |     |
| C.1 Dominios estructurales de las conexinas .....   | 14  |
| C.1.1 Nomenclatura de las conexinas .....   | 15  |
| C.1.2 Las conexinas también forman hemicanales .....  | 16  |
| C.2 Descripción general de los canales de unión comunicante. ....                                     | 17  |
| C.2.1 Biosíntesis y degradación de los canales de unión comunicante. ....                             | 19  |
| C.2.2 Función de los canales de Unión Comunicante .....   | 21  |
| C.2.3 Estudio de los canales de unión comunicante .....   | 25  |
| C.2.3.1 Expresión exógena de cDNAs codificando para las Cxs .....                                     | 25  |
| C.2.3.2 Métodos utilizados para estudiar el acople celular vía los canales de unión comunicante ..... | 25  |
| C.2.3.3 Modulación del cierre de los canales de unión comunicante .....                               | 27  |
| C.2.4 Propiedades biofísicas de los canales de unión comunicante .....                                | 28  |
| C.3 Propiedades eléctricas de los canales de unión comunicante formados por la Cx30.2 .....           | 30  |
| C.4 Propiedades eléctricas de los canales de unión comunicante formados por la Cx36 .....             | 31  |

|  |    |
|--|----|
| 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....  | 33 |
| 3. HIPÓTESIS .....   | 34 |
| 4. OBJETIVO GENERAL .....  | 34 |
| 4.1. OBJETIVOS PARTICULARES .....  | 34 |
| 5. MATERIAL Y MÉTODOS .....  | 35 |
| 5.1 Modelo animal .....  | 35 |
| 5.2 RT-PCR de la Cx30.2 en islotes de Langerhans y testículo .....   | 35 |
| 5.3 Detección de la Cx30.2 por western blot en islotes de Langerhans .....                                       | 36 |
| 5.4 Detección de la Cx30.2 en islotes de Langerhans por inmunohistoquímica ....                                  | 36 |
| 5.5 Inmunofluorescencia de la Cx30.2 en secciones de páncreas y células beta<br>cultivadas .....                 | 37 |
| 5.6 Aislamiento de islotes de Langerhans .....   | 37 |
| 5.7 Cultivo de islotes de Langerhans incubados con glucosa .....   | 37 |
| 5.8 Cultivo de células beta pancreáticas .....   | 38 |
| 5.9 Aislamiento de RNA y síntesis de cDNA de islotes de Langerhans .....   | 38 |
| 5.10 RT-PCR de tiempo real (qRT-PCR) de islotes incubados con glucosa .....                                      | 38 |
| 5.11 Análisis estadístico del qRT-PCR .....  | 39 |
| 6. RESULTADOS .....  | 40 |
| 6.1 Expresión del transcrito y la proteína de la Cx30.2 en los islotes de Langerhans                             | 40 |
| 6.2 Distribución celular de la Cx30.2 en los islotes de Langerhans .....   | 40 |
| 6.3 La Cx30.2 co-localiza con la Cx36 en las células beta pancreáticas .....                                     | 41 |
| 6.4 Expresión de la Cx30.2 en áreas de contacto intercelular en las células<br>endoteliales de los islotes ..... | 45 |
| 6.5 Modulación del transcrito de la Cx30.2 por glucosa en islotes de Langerhans ..                               | 46 |
| 7. DISCUSIÓN .....   | 48 |
| 8. CONCLUSIÓN .....  | 51 |
| 10. REFERENCIAS .....  | 52 |
| 11. ANEXO .....  | 60 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Imágenes del páncreas de ratón teñido con hematoxilina y eosina . . . . .                                | 1  |
| Figura 2. Diferencias en la arquitectura de los islotes entre roedor y humano . . . . .                            | 2  |
| Figura 3. Esquema de la microvasculatura de un islote de Langerhans . . . . .                                      | 3  |
| Figura 4. Vasculatura del tejido endocrino del páncreas . . . . .  | 4  |
| Figura 5. Representación de las vías metabólicas que sigue la glucosa . . . . .                                    | 7  |
| Figura 6. Regulación paracrina entre los diferentes tipos celulares de los islotes pancreáticos . . . . .          | 10 |
| Figura 7. Mecanismos de acoplamiento-Secreción de insulina . . . . .   | 12 |
| Figura 8. Actividad eléctrica de las células beta pancreáticas . . . . .   | 13 |
| Figura 9. Dominios estructurales de las conexinas . . . . .  | 15 |
| Figura 10. Estructura de los canales de unión comunicante . . . . .  | 18 |
| Figura 11. Imagen del ciclo de vida de las conexinas . . . . .   | 20 |
| Figura 12. Dependencia al voltaje de los canales de unión comunicante homotípicos . . . . .                        | 30 |
| Figura 13. Expresión del transcrito y la proteína de la Cx30.2 en islotes de Langerhans de ratón . . . . .         | 40 |
| Figura 14. La proteína de la Cx30.2 se expresa en las células beta pancreáticas de ratón . . . . .                 | 41 |
| Figura 15. La Cx30.2 se expresa en el citoplasma y en la membrana de las células beta pancreáticas. . . . .        | 43 |
| Figura 16. La Cx30.2 también se expresa en el citoplasma y en la membrana de las células beta en cultivo . . . . . | 44 |
| Figura 17. Expresión de la Cx30.2 en la membrana de las células endoteliales vasculares de los islotes. . . . .    | 45 |
| Figura 18. Integridad del RNA aislado de islotes incubados con glucosa . . . . .                                   | 46 |
| Figura 19. Los niveles de mRNA de la Cx30.2 se modulan dependiendo de la concentración de glucosa . . . . .        | 47 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| Tabla 1. Principales hormonas producidas en los islotes pancreáticos y sus acciones . . . . .                              | 9  |
| Tabla 2. Acciones metabólicas de la insulina en tejidos periféricos . . . . .  | 14 |
| Tabla 3. Nomenclatura de las conexinas en el humano y el ratón . . . . .   | 16 |
| Tabla 4. Distribución de Cxs en las células secretoras de distintos órganos y glándulas . . . . .                          | 22 |
| Tabla 5. Enfermedades asociadas a alguna alteración en los genes de las conexinas . . . . .                                | 24 |
| Tabla 6. Conductancias unitarias registradas de canales homotípicos de cada Cx . . . . .                                   | 28 |
| Tabla 7. Propiedades biofísicas de los canales de unión comunicante homotípicos formados por la Cx30.2 y la Cx36 . . . . . | 32 |

## ABREVIATURAS

|                                  |  |
|----------------------------------|--|
| aa                               | Aminoácidos                                      |
| cAMP                             | Monofosfato de adenosina cíclico                 |
| ADP                              | Difosfato de adenosina                           |
| ATP                              | Trifosfato de adenosina                          |
| BSA                              | Albúmina de suero bovino                         |
| Ca <sup>2+</sup>                 | Ión calcio                                       |
| [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> | Calcio intracelular                              |
| cDNA                             | Ácido desoxirribonucleico complementario         |
| Cl <sup>-</sup>                  | Ion cloro  |
| CO <sub>2</sub>                  | Dióxido de carbono                               |
| Cx                               | Conexina   |
| DAPI                             | 4',6-diamidino-2-fenilindol                      |
| DMEM                             | Medio de eagle modificado por Dulbeco            |
| DNA                              | Ácido desoxirribonucleico                        |
| FITC                             | Isotiocianato de fluoresceina                    |
| GAPDH                            | Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa          |
| g <sub>j</sub>                   | Conductancia de unión macroscópica               |
| γ <sub>j</sub>                   | Conductancia unitaria                            |
| GH                               | Hormona del crecimiento                          |
| GHRH                             | Hormona liberadora de la hormona del crecimiento |
| GnRH                             | Hormona liberadora de gonadotropina              |
| GLUT-2                           | Transportador de glucosa-2                       |
| HRP                              | Peroxidasa de rabano                             |
| IgG                              | Inmunoglobulina G                                |
| I <sub>j</sub>                   | Corriente de Unión                               |
| IP3                              | 1,4,5-Trisfosfato de inositol                    |
| IRS                              | Receptor de insulina                             |
| K <sup>+</sup>                   | Ión Potasio                                      |
| K <sub>ATP</sub>                 | Canales de potasio dependientes de ATP           |
| Kb                               | Kilobases  |
| kDa                              | kiloDalton                                       |

|                 |   |   |
|-----------------|---|---|
| mRNA            | Ácido ribonucleico mensajero  |   |
| min             | minutos   |   |
| Na <sup>+</sup> | Ión sodio   | I |
| NAD             | Dinucleótido de nicotinamida y adenina                                  |   |
| PBS             | Buffer de fosfatos  |   |
| PI3K            | Fosfatidil inositol 3 cinasa  |   |
| pKa             | Constante de acidez   |   |
| PKA             | Proteína cinasa A   |   |
| PP              | Polipéptido pancreático   |   |
| pS              | picoSiemens   |   |
| qRT-PCR         | RT-PCR de tiempo real   |   |
| RNA             | Ácido ribonucleico  |   |
| SFB             | Suero bovino fetal  |   |
| SNC             | Sistema Nervioso Central  |   |
| TBS             | Buffer de Tris  |   |
| TRH             | Hormona liberadora de tirotropina                                       |   |
| TRITC           | Isotiocianato de tetrametil rodamina                                    |   |
| VEGF-A          | Factor de crecimiento endotelial vascular-A                             |   |
| V <sub>o</sub>  | Voltaje al cual se inactivan el 50% de los canales de unión comunicante |   |
| V <sub>j</sub>  | Voltaje transunión  |   |

## RESUMEN

Durante los últimos trece años se ha considerado que la conexina 36 (Cx36) es la única proteína de unión comunicante expresada en las células beta pancreáticas. No obstante, el registro de la corriente de unión entre pares aislados de células beta recién disociados demostró que las propiedades eléctricas de dichas células eran semejantes, pero no idénticas a las de la Cx36, por lo cual se propuso que las uniones comunicantes entre estas células podrían estar formadas por más de una conexina. En el presente estudio investigamos la expresión del transcrito y la proteína de la Cx30.2 en los islotes pancreáticos de ratón. El mRNA y la proteína de la Cx30.2 fueron identificados en preparaciones de islotes aislados, mediante RT-PCR de tiempo real y western blot, respectivamente. Con el objeto de estudiar su distribución celular-específica se realizaron estudios de inmunohistoquímica, los cuales mostraron que las células beta positivas a la insulina también se tiñen para la Cx30.2. Para investigar la distribución subcelular de la Cx30.2 se realizaron estudios de doble marcaje por inmunofluorescencia en criosecciones pancreáticas. Estos estudios revelaron que la fluorescencia de la Cx30.2 y la Cx36 co-localizan en la membrana de las células beta en áreas de contacto célula-célula, en el 71% de los islotes de ratón estudiados. En las secciones pancreáticas también se observó un abundante y fino puntilleo de la Cx30.2 en el citoplasma de las células beta. En cultivos de células beta incubadas con concentraciones estimuladoras de glucosa, la Cx30.2 también se localizó en el citoplasma y en la membrana de las células beta. Adicionalmente, la Cx30.2 se identificó en zonas de contacto célula-célula de las células endoteliales de los vasos sanguíneos de los islotes, identificadas por ser positivas para el marcador CD31. El análisis de RT-PCR de tiempo real reveló una disminución significativa en el transcrito de la Cx30.2, en preparaciones de islotes incubados durante 24 horas con 22 mM de glucosa en comparación con 3.3 mM.

En conclusión, se demostró por primera vez la Cx30.2 se expresa en las células beta pancreáticas y en las células endoteliales vasculares de los islotes pancreáticos de ratón. Lo cual es relevante, ya que rompe el paradigma actual de que únicamente la Cx36 se expresa en las células beta pancreáticas. Lo anterior sugiere que la Cx30.2 también intercomunica a las células beta y por lo tanto puede tener un papel relevante en la regulación de la secreción de insulina, junto con la Cx36.

## ABSTRACT

For the last thirteen years the connexin 36 (Cx36) was considered the only connexin expressed in pancreatic beta cells. Although similar, the biophysical properties of junctional conductance ( $g_j$ ), recorded in dual voltage clamped beta cell pairs were not identical to those of Cx36 channels as recorded in cell expression systems. Therefore, it has been proposed that the junctions between these cells could be formed by more than one connexin.

In the present study, we investigated the expression of Cx30.2 transcript and protein in mouse pancreatic islets. Cx30.2 mRNA and protein were identified in isolated islet preparations by real time RT-PCR and western blot, respectively. In order to study cell-specific distribution of Cx30.2, immunohistochemical studies were performed, which showed that insulin-positive beta cells were stained for Cx30.2. To investigate the subcellular distribution of Cx30.2, we performed double-labeled immunofluorescence studies in pancreatic cryosections. These studies revealed that Cx36 and Cx30.2 fluorescence co-localize at the membrane of beta cells, in the cell-cell junctions in 71% of mouse islets studied. Pancreatic sections also showed abundant and tiny reactive spots for Cx30.2 in the beta cell cytoplasm. In beta cell cultures incubated with stimulatory glucose concentrations, the Cx30.2 also localized in the cytoplasm and on the membrane of these cells. Additionally, Cx30.2 areas were identified in cell-cell junctions of endothelial cells of blood vessels in the islets, which were positive for the CD31 marker. The analysis of real-time RT-PCR revealed a significant decrease of Cx30.2 transcript, in islet preparations incubated for 24 h with 22 mM glucose as compared to 3.3 mM.

In conclusion, it was demonstrated for the first time that Cx30.2 is expressed in pancreatic beta cells and vascular endothelial cells of mouse pancreatic islets. This is important because it breaks the current paradigm that only Cx36 is expressed in pancreatic beta cells. In addition, these results suggest that Cx30.2 intercommunicates beta cells and therefore may have an important role in regulating insulin secretion, together with the Cx36.

# 1. INTRODUCCIÓN

## A. PÁNCREAS E ISLOTES DE LANGERHANS

### A.1 Generalidades del páncreas

El páncreas de los mamíferos está situado en la cavidad abdominal, entre el bazo y el duodeno. En el humano el páncreas está compuesto por dos lóbulos, el esplénico o dorsal y el duodenal o ventral. Para su estudio, el páncreas anatómicamente se ha dividido en tres regiones: cabeza, cuerpo y cola, las cuales pueden identificarse por la relación que guardan entre sí con los órganos adyacentes (Lindsay, et al., 2006). Así, el área cercana al duodeno se considera la cabeza; la región cercana al bazo, la cola; mientras que el área central representa el cuerpo (Figura 1A). El páncreas está formado por dos compartimentos, diferentes en morfología y función: 1) el tejido exocrino, que forma cerca del 90% del páncreas total y está constituido por células acinares, éste excreta enzimas y bicarbonato de sodio al duodeno para la digestión de los nutrientes y 2) el tejido endocrino, el cual secreta hormonas que regulan los niveles de la glucosa sanguínea. Los islotes de Langerhans se consideran la unidad funcional del páncreas endocrino y son agregados esféricos de células endocrinas que se encuentran distribuidos entre el tejido acinar como se observa en la Figura 1B (Pipeleers, 1987).

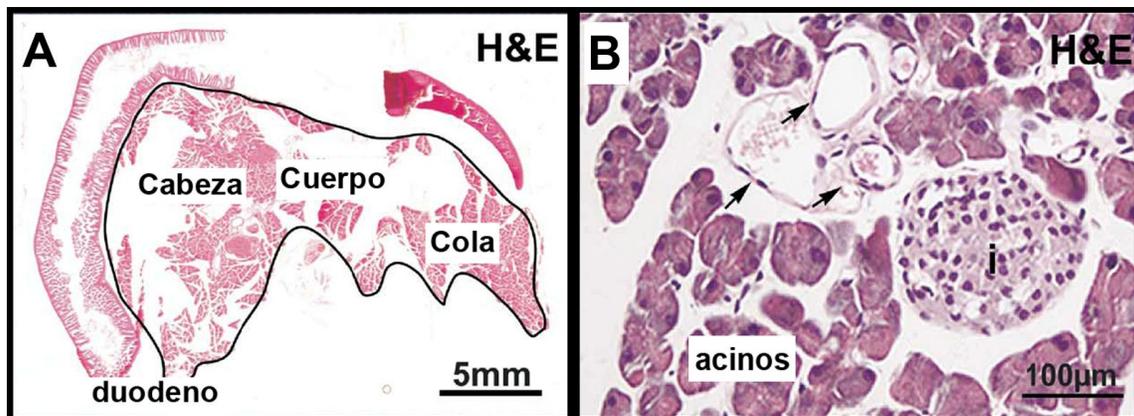


Figura 1. Imágenes del páncreas de ratón teñido con hematoxilina y eosina (H&E). A) Relación del páncreas con los órganos adyacentes y su división anatómica en cabeza, cuerpo y cola. B) Imagen de una sección de páncreas de ratón, mostrando un islote de Langerhans (i) rodeado por el tejido acinar y los conductos (flechas). Imagen Modificada de Lindsay, et al., 2006.

## A.2 Arreglo estructural y composición de los islotes de Langerhans

Los islotes de Langerhans representan cerca del 2% del volumen total del páncreas. Los islotes pancreáticos están formados por células  $\alpha$ , las cuales secretan glucagon; células  $\beta$  (beta), secretoras de insulina; células  $\delta$ , secretoras de somatostatina; células PP, que secretan polipéptido pancreático y células  $\mu$ , secretoras de grelina. En el páncreas humano adulto hay cerca de un millón de islotes. El tamaño de los islotes de ratón y humano varía entre 50 y 500  $\mu\text{m}$  de diámetro y cada islote está formado por entre 50 y 300 células endocrinas (Pipeleers, 1987).

En cuanto a la organización estructural de los islotes, en el ratón las células beta se encuentran predominantemente en el centro de los islotes y en la periferia se localizan los demás tipos celulares. Las células beta constituyen aproximadamente el 75% del volumen insular total, mientras que las células  $\alpha$  cerca del 20% y las células  $\delta$ , PP y  $\mu$  constituyen cerca del 5%. En los islotes del páncreas humano la distribución celular es distinta, pues las células beta se encuentran dispersas entre los demás tipos celulares y corresponden a cerca del 55%, mientras que las células  $\alpha$  al 35% y las  $\delta$  a cerca del 10% (Figura 2) (Brisova & Powers, 2008).

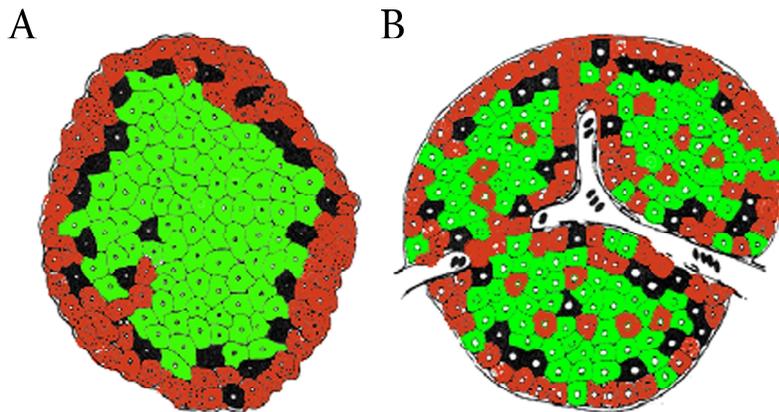


Figura. 2. Diferencias en la arquitectura de los islotes entre roedor y humano. A) Imagen que muestra que en los islotes de rata las células  $\beta$  (verdes) se localizan en el centro de los islotes y las células  $\alpha$  (rojas) en la periferia de éstos. En negro se ilustran las células  $\delta$  productoras de somatostatina. B) En los islotes de humano las células  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$  se encuentran dispersas a lo largo del volumen del islote. Imagen modificada de Hadley, 2000.

### A.3 La vasculatura de los islotes de Langerhans

La vasculatura tiene un papel fundamental en la función de los islotes de Langerhans. La arquitectura vascular está estrechamente asociada con la fisiología del páncreas endocrino y exocrino, como se describe a continuación.

Los islotes de Langerhans y el parénquima exocrino del páncreas reciben el flujo sanguíneo de tres arterias: la esplécnica, la pancreático-duodenal superior y la pancreático-duodenal inferior, las cuales se ramifican en una gran red de capilares (Lewis, et al., 1998). En la periferia de los islotes existen vénulas y un sistema insulino-portal que comprende pequeños vasos que conectan los capilares de los islotes con los del parénquima exocrino como se muestra en la Figura 3 (Wayland, 1997).

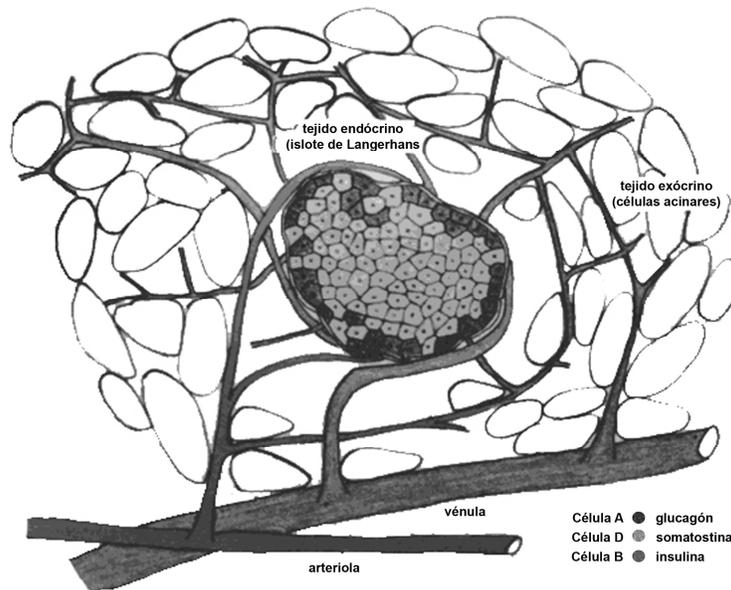


Figura 3. Esquema de la microvasculatura de un islote de Langerhans, mostrando la relación que existe entre las células de los islotes y las células pancreáticas acinares. Imagen tomada de Wayland, 1997.

Los islotes pancreáticos se encuentran vascularizados por una extensa red de capilares, la cual es aproximadamente 5 veces más densa en los islotes, que en el tejido exocrino que los rodea (Richards, et al., 2010). Adicionalmente, los capilares de los islotes son más tortuosos (Figura 4A), de una pared más delgada y de un diámetro significativamente mayor ( $5.27 \mu\text{m}$ ), que los capilares del tejido exocrino ( $4.35 \mu\text{m}$ ). Además la frecuencia de eventos fenestrados, es cerca de 10 veces mayor en el tejido endocrino que en el exocrino (Fraser & Henderson, 1980; Henderson & Moss, 1985).

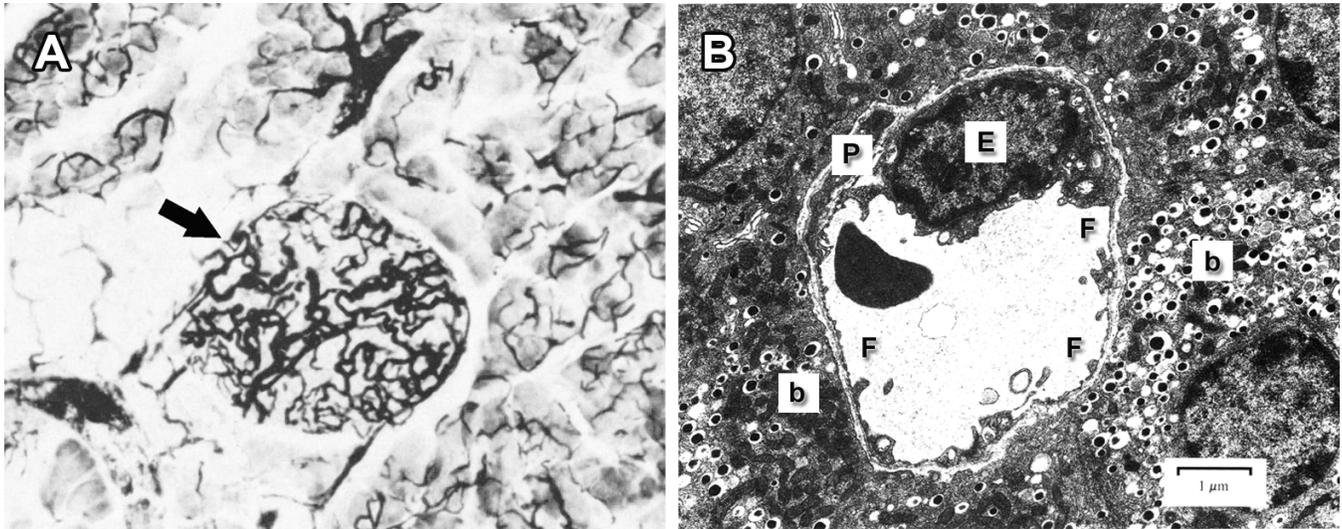


Figura 4. Vasculatura del tejido endocrino del páncreas. A) imagen del páncreas de ratón, mostrando una mayor densidad de vasos sanguíneos y más tortuosos en los islotes (flecha), en comparación con el tejido acinar alrededor de los islotes. Imagen tomada de Henderson & Daniel, 1979. B) Capilar endocrino el cual está formado por la célula endotelial (E), junto al pericito (P) y se encuentra en estrecha asociación con las células beta (b). El capilar presenta varios fenestros (F), los cuales son poros de cerca de 100 nm y resultan de la fusión de la membrana plasmática apical y basolateral. Imagen tomada de Henderson & Moss, 1985.

A pesar de que los islotes constituyen tan solo el 2% de la masa del páncreas, ellos reciben cerca del 10% del flujo sanguíneo pancreático total (Wayland, 1997; Henderson & Moss, 1985; Richards, et al., 2010). En los islotes de Langerhans la vasculatura es relativamente permeable, esto debido a que las células endoteliales son altamente fenestradas, lo que permite a los capilares de los islotes: 1) liberar nutrientes, así como factores de crecimiento y 2) detectar rápidamente la concentración de glucosa. Lo anterior, capacita a los islotes para responder rápidamente a las fluctuaciones de glucosa sanguínea y ajustar la secreción de insulina conforme se requiere (Richards, et al., 2010).

Las células endoteliales de los vasos sanguíneos están involucradas en muchas funciones fisiológicas incluyendo el control del tono vasomotor, el tráfico de las células sanguíneas, el balance hemostático, la permeabilidad, la proliferación, la supervivencia y la inmunidad. Sin embargo, las células endoteliales no son las únicas que forman los vasos sanguíneos, sino que éstos también están formados por pericitos (células denominadas así a causa de su proximidad a las células endoteliales) y por células del

músculo liso vascular, las cuales dan soporte a los vasos sanguíneos de todos los tamaños (Richards, et al., 2010).

En los islotes, las células beta pancreáticas se encuentran íntimamente asociadas con las células endoteliales. Se ha descrito que el flujo sanguíneo de los islotes puede regularse por factores metabólicos y no metabólicos. La glucosa incrementa casi al doble el flujo sanguíneo de los islotes, pues como resultado del metabolismo de ésta se genera ATP y las señales de ATP a través de los receptores de adenosina A1 de los islotes aumentan el flujo sanguíneo. La insulina disminuye dicho flujo en los islotes, probablemente por la hipoglucemia resultante más que por un efecto directo de hiperinsulinemia. Otros nutrientes y hormonas tienen efectos directos sobre el flujo sanguíneo interactuando con vasoconstrictores y vasodilatadores. Además el sistema nervioso central (SNC) también tiene impacto sobre la perfusión de los islotes. En resumen, el flujo sanguíneo de los islotes es cuidadosamente regulado por varios nutrientes y factores de crecimiento en estrecha relación con el estado metabólico del organismo (Richards, et al., 2010).

Respecto al flujo sanguíneo, los estudios en tiempo real con trazadores fluorescentes, en islotes de ratón, han evidenciado que el flujo sanguíneo de los capilares perfunde primero a las células beta antes que a los otros tipos celulares de los islotes de Langerhans (Stagner & Samols, 1992; Richards, et al., 2010).

Los capilares de la periferia de los islotes se localizan adyacentes al tejido endocrino y exocrino, lo que deriva en una relación funcional entre ambos tejidos del páncreas. Se han documentado las consecuencias fisiológicas del flujo sanguíneo de los islotes al tejido exocrino: en ausencia de insulina el páncreas exocrino se atrofia y progresivamente pierde su capacidad de excretar enzimas digestivas. Las hormonas de los islotes, glucagon y somatostatina, también han demostrado tener un efecto inhibitor sobre la secreción exocrina. La inyección de glucagon causa desgranulación de los acinos de rata y disminuye la concentración de proteínas y el volumen de jugo pancreático en humanos. En tanto que la infusión de somatostatina en perros, abatió completamente la producción de jugo pancreático en respuesta a la ingesta de alimentos. Lo anterior apunta a que el flujo sanguíneo de los islotes tiene un papel esencial en la modulación de la actividad del páncreas exocrino (Fraser & Henderson, 1980).

Además la vasculatura también tiene un papel importante en el desarrollo correcto de los islotes, ya que la sobre-expresión del factor de crecimiento endotelial vascular-A (VEGF-A, por sus siglas en inglés Vascular Endothelial Growth Factor-A), da por resultado un páncreas hiper-vascularizado, con un incremento de 3 veces en el número y área de los islotes, así como una expresión ectópica de insulina en el intestino en desarrollo, lo cual sugiere que la vasculatura no solo es crítica durante el inicio del desarrollo del páncreas, sino también a lo largo de la maduración de los islotes de Langerhans (Richards, et al., 2010).

La estrecha relación entre las células beta y endoteliales de los islotes (Figura 4B), es importante no solo para el desarrollo del páncreas, sino también para la función de los islotes maduros. En modelos de ratones la deficiencia en la expresión del gen VEGF-A conduce a una severa disminución en la densidad vascular, resultando en intolerancia a la glucosa. Estos estudios sugieren que la pérdida de células endoteliales en los islotes puede afectar negativamente la secreción de insulina y contribuir a la intolerancia a la glucosa (Richards, et al., 2010).

## **B. SECRECIÓN DE INSULINA Y SUS ACCIONES**

### **B.1 Homeostasis de la glucosa**

La glucosa es un carbohidrato cuya oxidación constituye uno de los procesos principales de obtención de energía para el organismo.

La glucosa se obtiene de tres fuentes: 1) por ingesta, mediante la absorción intestinal posterior a la digestión de los carbohidratos, 2) por glucogenólisis, a partir de la ruptura del glucógeno y 3) mediante la gluconeogénesis, que consiste en la síntesis de glucosa a partir de precursores como lactato, piruvato y aminoácidos (especialmente alanina y glutamina). Existen múltiples destinos metabólicos para la glucosa que es transportada a las células, (Figura 5) (Cryer, 2001).

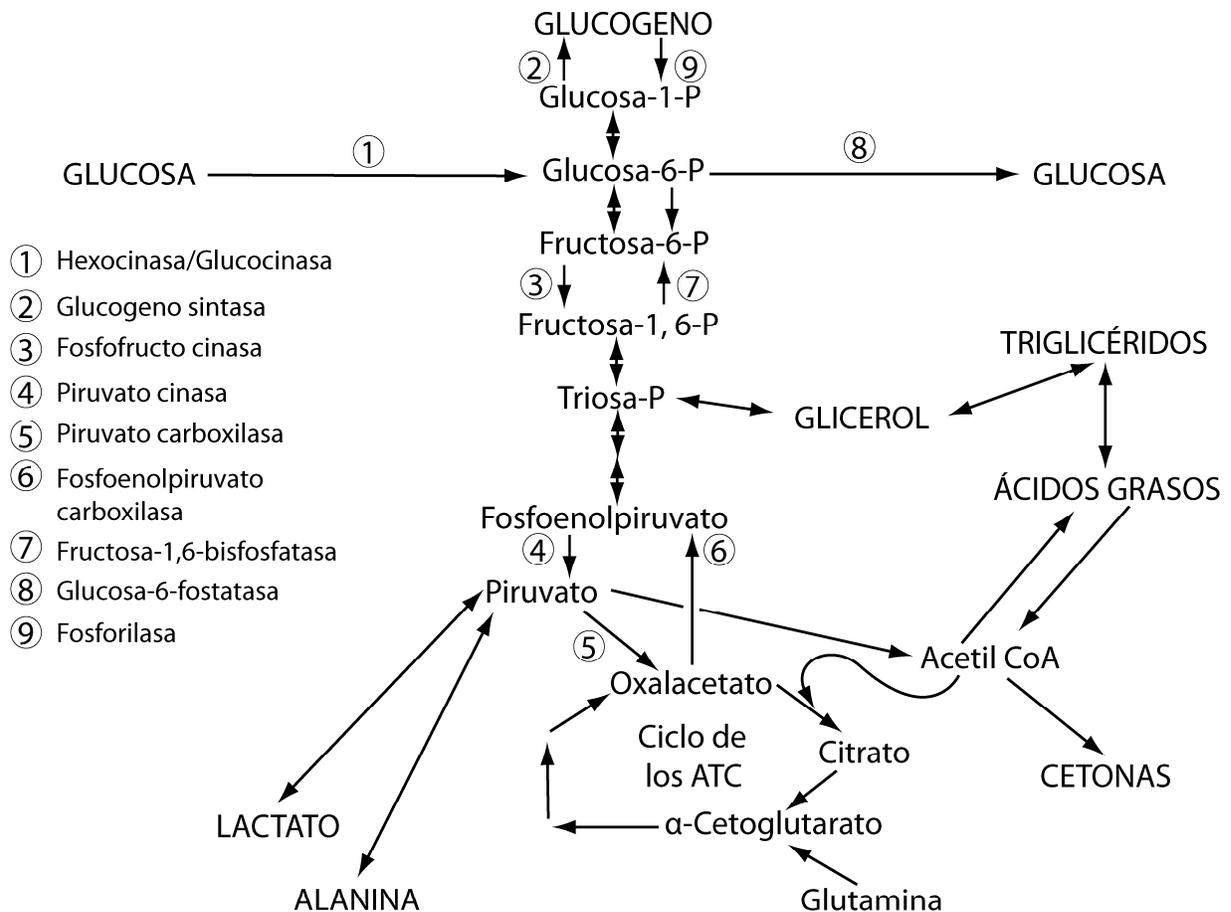


Figura 5. Representación de las vías metabólicas que sigue la glucosa. Modificada de Cryer, 2001.

Las velocidades de entrada de glucosa endógena a la circulación y las de salida de la circulación a otros tejidos como el cerebro, son reguladas de manera coordinada (Gerich, 2000). La disminución de la glucosa plasmática se debe a la hormona insulina y el aumento en la concentración de glucosa se debe al glucagon y a la adrenalina, tal que el balance de la glucosa sanguínea se mantiene asegurando una continua provisión de glucosa al cerebro (Gerich, 2000).

La función adecuada de las células beta productoras de insulina es crucial para la homeostasis de la glucosa, el daño a estas células propicia el desarrollo de diabetes mellitus, el desorden metabólico más común en el humano (Leibiger, et al., 2008).

La concentración de glucosa sanguínea se incrementa posterior a la ingesta de alimentos y ésta estimula la secreción de insulina. La insulina ejerce sus efectos en hígado,

músculo esquelético y tejido adiposo, en donde favorece la utilización y/o almacenamiento de ésta.

Metabolismo de la glucosa en el hígado. Los nutrientes absorbidos del intestino entran a la vena porta y de ahí alcanzan directamente el hígado. Dada su localización anatómica es razonable que el hígado funcione como un sensor de glucosa (Yamada & Katagiri, 2007). El hígado es la mayor fuente de glucosa endógena mediante las vías de glucogenólisis y gluconeogénesis (Figura 5). En condiciones de una disminución severa de glucosa sanguínea (por ejemplo durante el ayuno), el hígado provee la energía necesaria mediante la beta oxidación de los ácidos grasos y en particular al cerebro, mediante la gluconeogénesis. En respuesta a un aumento de glucosa, el hígado la almacena en forma de glucógeno, o bien la glucosa puede ser convertida a grasa, la cual puede permanecer en el hígado o ser transportada a otros tejidos mediante lipoproteínas de muy baja densidad (Cryer, 2001).

Metabolismo de la glucosa en el músculo. El músculo también puede almacenar glucosa en forma de glucógeno o metabolizar la glucosa a través de la glucólisis a piruvato, el cual puede ser reducido a lactato. El lactato liberado del músculo es transportado al hígado, donde sirve como precursor gluconeogénico. La alanina y la glutamina también pueden ser transportados del músculo al hígado, donde se utilizan como precursores gluconeogénicos. Durante el ayuno el músculo reduce la entrada de glucosa, oxida los ácidos grasos para proveer la energía necesaria y a través de la proteólisis movilizar a los aminoácidos, que transportados al hígado son precursores gluconeogénicos para la síntesis de glucosa (Cryer, 2001).

Metabolismo de la glucosa en el tejido adiposo. El tejido adiposo también puede utilizar la glucosa para la síntesis de ácidos grasos o de glicerol-3-fosfato, el cual luego puede esterificar para formar triacilgliceroles. Durante el ayuno los adipocitos disminuyen la utilización de la glucosa y satisfacen sus necesidades energéticas mediante la beta oxidación de los ácidos grasos (Cryer, 2001).

Las hormonas secretadas por los diferentes grupos celulares que forman los islotes de Langerhans regulan el metabolismo de los carbohidratos, como se resume en la Tabla 1.

Tabla 1. Principales hormonas producidas en los islotes pancreáticos y sus acciones

| Hormona  | Insulina   | Glucagon  | Somatostatina  | Polipéptido Pancreático   | Grelina   |
|--|--|---|--|---|---|
| <b>Composición</b>                                   | Formada por dos cadenas: A de 21 residuos de aminoácidos (aa) y B de 30, unidas por dos puentes disulfuro entre cistinas                       | Péptido formado por una sola cadena de 29 residuos de aa  | Existen dos formas, un polipéptido de 28 residuos de aa, el cual incluye la somatostatina 14   | Polipéptido formado por 36 residuos de aa   | Péptido de 28 residuos de aa  |
| <b>Localización del gen en el humano (cromosoma)</b> | 11   | 2   | 3  | 17  | 3   |
| <b>Estímulos para su secreción</b>                   | El principal secretagogo fisiológico es la glucosa. aa como glutamina, alanina y leucina y algunos ácidos grasos como el palmitato y el oleato | Hipoglucemia y activación de los nervios simpáticos<br><br>Algunos aa como alanina, glicina, serina y cisteina  | La glucosa, algunos aa como la alanina y la arginina   | La acetilcolina, la ingesta de proteínas, el ayuno, el ejercicio, la hipoglucemia aguda   | El ayuno, la hipoglucemia   |
| <b>Inhiben su secreción</b>                          | La insulina  | La insulina y la somatostatina  | Ácidos grasos y agonistas alfa adrenérgicos  | La glucosa, la somatostatina  | La ingesta, en especial de carbohidratos  |
| <b>Acciones</b>                                      | La insulina tiene efectos anabólicos: aumenta el almacenamiento de la glucosa, ácidos grasos y aminoácidos                                     | El glucagon presenta efectos catabólicos: es glucogenolítico, gluconeógeno, lipolítico y cetogénico. Eleva la glucemia por que estimula la adenilato ciclasa en las células hepáticas | Inhibe la secreción de insulina, glucagon y PP Actúa como: neurotransmisor en el SNC; inhibe la secreción en la hipófisis, tiroides, páncreas exocrino y riñones | Inhibe la secreción de la insulina y la somatostatina, inhibe la secreción gástrica y de jugo pancreático, reduce la motilidad intestinal | Regula la secreción de la hormona del crecimiento<br><br>Estimula el apetito y es adipogénica |

Se sabe también que existe una comunicación directa, así como también paracrina y/o autocrina entre los diferentes tipos celulares de los islotes de Langerhans, como se resume en la Figura 6, las cuales actúan en conjunto con los nervios autonómicos y las

hormonas liberadas a través de la vasculatura de los islotes para asegurar la homeostasis de los nutrientes (Kanno, et al., 2002; Kelly, et al., 2011). Por ejemplo, se ha reportado la auto-regulación por insulina, es decir, la liberación de insulina inducida por insulina. Como se mencionó antes, el flujo sanguíneo perfunde primero a las células beta y después a las células  $\alpha$  y  $\delta$ , lo que implica que el glucagon y somatostatina liberados deben pasar a la circulación sistémica antes de actuar sobre las células beta. Además éstas dos hormonas pueden influenciar la secreción de insulina por un efecto local paracrino sobre las células beta (Kanno, et al., 2002). También se ha propuesto que la acetilcolina secretada por las células  $\alpha$ , es una señal paracrina en los islotes de Langerhans de humano. Las células  $\alpha$  en respuesta a concentraciones bajas de glucosa (3 mM) liberan acetilcolina sensibilizando a las células beta para que respondan al incremento de glucosa, limitando de esta manera las fluctuaciones en la concentración de glucosa plasmática (Rodríguez-Díaz, et al., 2011).

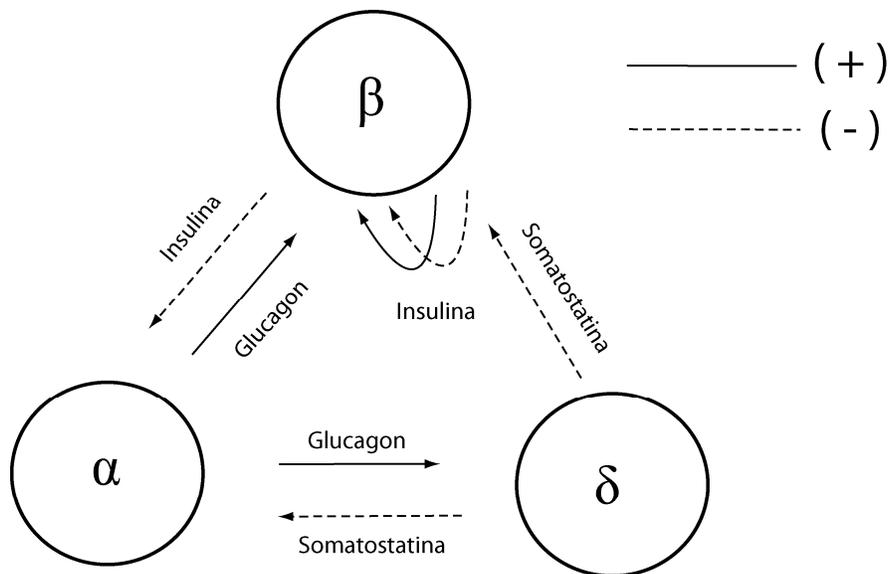


Figura 6. Regulación paracrina entre los diferentes tipos celulares de los islotes pancreáticos. Las flechas con línea continua indican una regulación estimuladora y las flechas discontinuas un efecto inhibitor de la secreción. Imagen modificada de Kanno, et al., 2002.

## B.2 Secreción de insulina

Las células beta pancreáticas secretan insulina en respuesta a un aumento en la concentración de glucosa extracelular. El mecanismo sensor de glucosa en éstas células

involucra principalmente al transportador de glucosa-2 (GLUT-2), a la glucocinasa y a los canales de  $K^+$  dependientes de ATP ( $K_{ATP}$ ) (Yamada & Katagiri, 2007). La concentración plasmática de glucosa en un individuo sano, en ayuno es de alrededor de 60-100 mg/dL, esta concentración aumenta después de la ingesta de alimentos, estimulando de cinco a diez veces la secreción de insulina basal.

La secreción de insulina estimulada por glucosa presenta una cinética bifásica: al inicio se observa un aumento rápido y transitorio en la secreción de insulina. Temporalmente se ha definido que la primera fase termina en un lapso de 10 min y ésta se atribuye a la liberación de los gránulos de insulina almacenados preformados. Le sigue una segunda fase, en la cual la glucosa amplifica de manera continua su propia señal, es sostenida y persiste hasta que los niveles de glucosa se normalizan. En ésta segunda fase se requiere del reclutamiento de gránulos de insulina de los almacenes intracelulares hacia la membrana plasmática e involucra la reorganización del citoesqueleto (Kalwat & Thurmond, 2013). La segunda fase es notoria en el humano y en ratas, pero relativamente baja y plana en casi todas las cepas de ratones (Grodski, 2003).

### **B.3 Acople estímulo-secreción de insulina**

La glucosa es el principal secretagogo fisiológico de las células beta pancreáticas. La insulina actúa en forma coordinada con otras hormonas y señales del sistema nervioso, garantizando su liberación adecuada en respuesta a los cambios en los niveles de glucosa sanguínea.

Cuando la concentración de glucosa extracelular es baja (5 mM), las células se encuentran en reposo. Si se mide la diferencia de potencial del interior de la célula con respecto al medio extracelular, la célula se encuentra polarizada, es decir, el interior es negativo, a lo cual se denomina potencial de reposo, que es de alrededor de -70 mV. Este potencial se mantiene principalmente por la bomba electrogénica  $Na^+K^+$ -ATPasa. Concentraciones de glucosa mayores a 5 mM inducen una despolarización de la membrana plasmática de un valor de -80 a -45 mV, esto se debe a que como resultado del metabolismo de la glucosa se genera ATP, el cual cierra canales de  $K_{ATP}$ . Los cambios en el cociente ATP/ADP intracelular regulan la actividad de dichos canales. La despolarización induce la apertura de canales de  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  tipo T dependientes de

voltaje, la entrada de estos iones a la célula ocasiona una mayor despolarización de la membrana plasmática (-20 mV), provocando que los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L se abran, permitiendo una mayor entrada de calcio y en consecuencia un incremento en la concentración de calcio intracelular  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , ocasionando la exocitosis de los gránulos de insulina (Figura 7) (Bertram, et al., 2007).

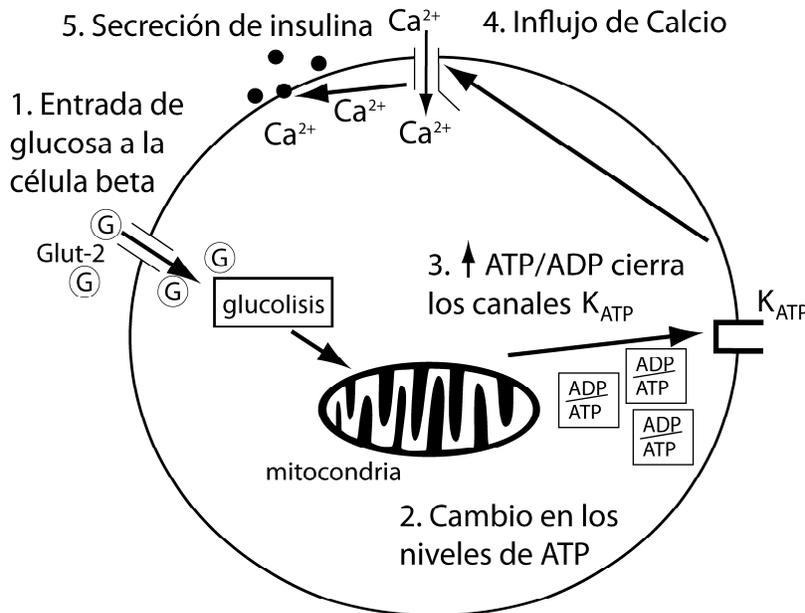


Figura 7. Mecanismos de acoplamiento-Secreción de insulina. Imagen modificada de Bertram, et al., 2007.

#### B.4 Actividad eléctrica de las células beta pancreáticas

El acoplamiento estímulo-secreción de insulina se encuentra íntimamente asociado con la actividad eléctrica que presentan las células beta. Una vez que la membrana es despolarizada, alrededor de los -45 mV, se generan oscilaciones en el potencial de membrana entre una fase silente (-55 mV) y una fase activa (-45 mV) (Figura 8A). Sobre la fase activa, se producen ráfagas de potenciales de acción, debidos a la activación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{K}^+$  dependientes del voltaje. A mayores concentraciones de glucosa (6-36 mM), la duración de la fase activa aumenta progresivamente hasta llegar a mantener un estado de disparo continuo de ráfagas de potenciales de acción (Figura 8B). La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la fase activa es necesaria para la exocitosis de los gránulos de insulina (Atwater, et al, 1994). Además se ha visto que dicha actividad eléctrica oscilatoria ocurre sincrónicamente en todas las células de

un islote (Figura 8C) (Meissner et al., 1976, Pérez Armendariz & Atwater, 1986) y que está asociada a oscilaciones en la concentración de  $[Ca^{2+}]_i$  (Figura 8D) (Santos et al., 1991), lo cual desencadena la secreción de insulina (Figura 8E) (Rosario et al., 1986).

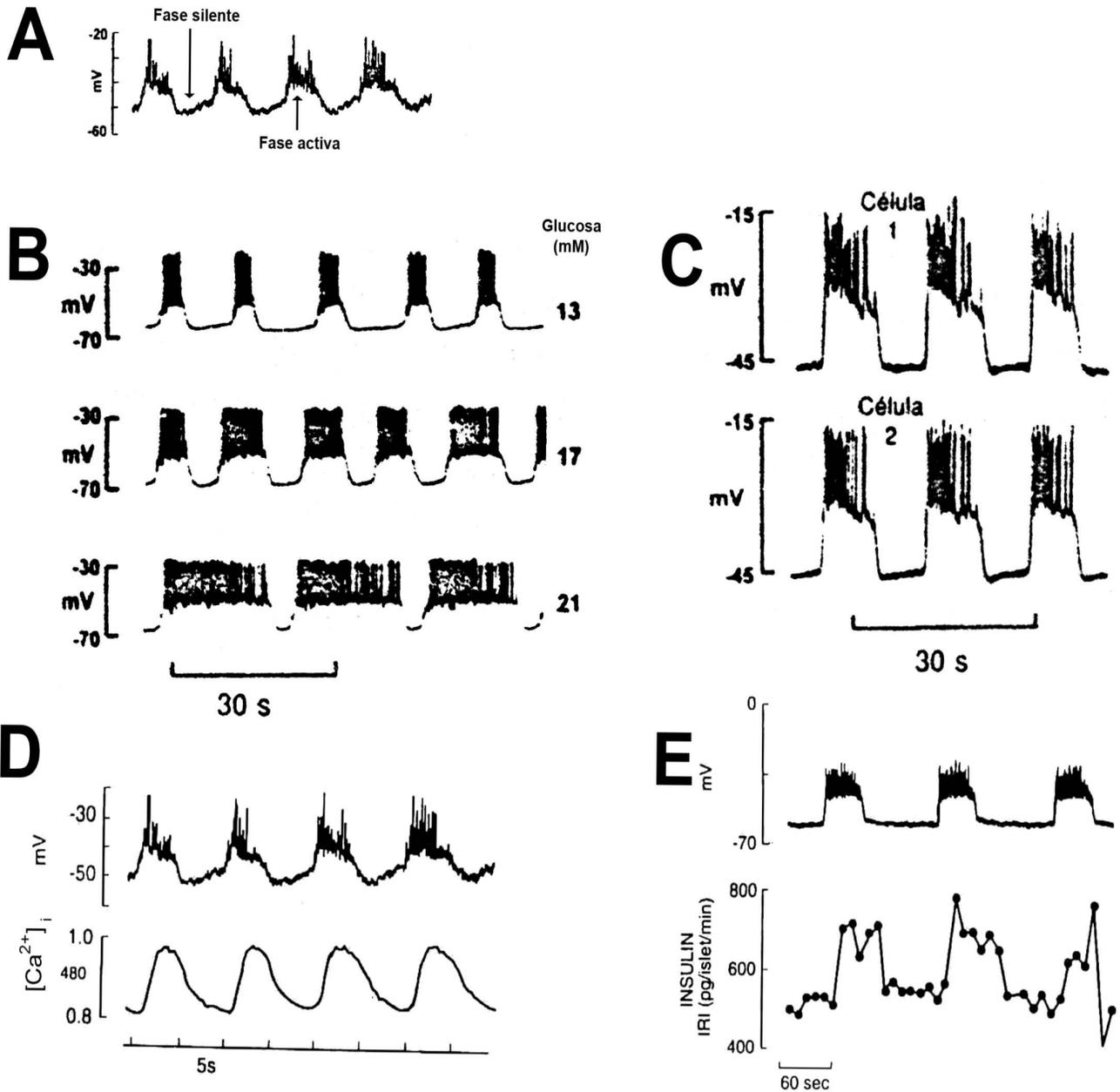


Figura 8. Actividad eléctrica de las células beta pancreáticas. Ésta se caracteriza por presentar ráfagas de potenciales de acción (A), la duración de la fase activa se alarga conforme se incrementa la concentración de glucosa (B). La actividad eléctrica es coordinada entre todas las células de un islote (C) y ocurre en sincronía con las oscilaciones de calcio intracelular (D) y la secreción de insulina (E). Imagen modificada de Pérez-Armendariz., et al, 1995.

## B.5 Acciones de la insulina

La insulina ejerce sus acciones a través de la unión a su receptor y la subsecuente activación de varias vías de señalización. El receptor de insulina está formado por dos subunidades  $\alpha$  extracelulares que contienen los sitios de unión a insulina y dos subunidades  $\beta$  transmembranales con actividad de proteína tirosina cinasa. La unión de la insulina a su receptor activa a la tirosina cinasa induciendo la autofosforilación de los residuos de tirosina de las subunidades  $\beta$ , luego se desencadena la fosforilación de los sustratos 1 y 2 del receptor de insulina (IRS-1 e IRS-2). Los sitios de fosforilación de tirosina de las proteínas IRS se unen a los dominios SH2 de varias moléculas de señalización como fosfatidil inositol 3-cinasa (PI3K) y la proteína 2 de unión al receptor de factor de crecimiento (Grb-2)(Leibiger, et, al., 2008). La acción de la insulina en los tejidos periféricos depende de las moléculas reclutadas y activadas en las vías de señalización, en la Tabla 2 se resumen dichas acciones.

Tabla 2. Acciones metabólicas de la insulina en tejidos periféricos

| <b>Tejido</b>              | <b>Estimula</b>   | <b>Inhibe</b>  |
|----------------------------|---|--|
| <b>Hígado</b>              | Síntesis de glucógeno<br>Lipogénesis<br>Entrada de aminoácidos<br>Síntesis de proteínas   | Producción de glucosa estimulada por glucagon, catecolaminas y cetogénesis |
| <b>Adiposo</b>             | Transporte y oxidación de glucosa.<br>Lipogénesis<br>Entrada de ácidos grasos<br>Síntesis de glucógeno<br>Síntesis de proteínas | Lipólisis (lipasa sensible a hormonas)                                     |
| <b>Músculo esquelético</b> | Transporte de glucosa y síntesis de glucógeno.<br>Entrada de aminoácidos<br>Síntesis de proteínas<br>Lipogénesis                | Proteólisis y liberación de aminoácidos                                    |

## C. CONEXINAS Y CANALES DE UNIÓN COMUNICANTE

### C.1 Dominios estructurales de las conexinas

Las conexinas (Cxs) son una familia de proteínas homólogas que forman los canales de unión comunicante, de los cuales se hablará más adelante. Las Cxs se caracterizan por

tener 4 dominios transmembranales, dos asas extracelulares, un dominio amino, un asa intracelular entre el segundo y tercer dominio transmembranal, así como una cola citoplasmática que se localiza al interior celular. Los cuatro dominios transmembranales forman el poro del canal y a su vez están conectados por las dos asas extracelulares, las cuales participan en el reconocimiento célula-célula y el proceso de acoplamiento para formar un canal de unión comunicante (Figura 9) (Kumar & Gilula, 1996; Willecke, et al., 2002). Cabe mencionar que los dominios transmembranales y las asas extracelulares se encuentran altamente conservados en la familia de las Cxs.

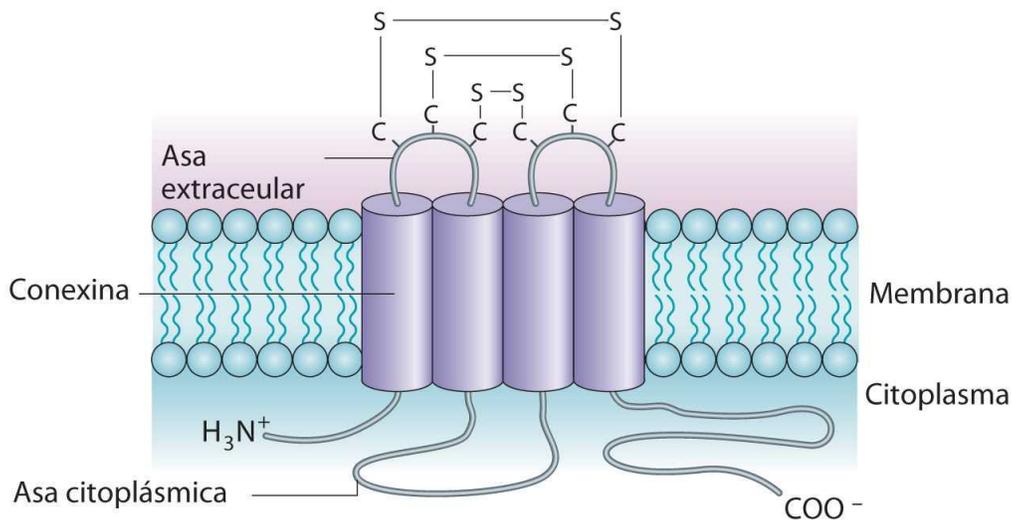


Figura 9. Dominios estructurales de las Cxs. Imagen mostrando que la proteína atraviesa 4 veces la membrana. Los segmentos que atraviesan la membrana y los que forman las asas extracelulares conservan una alta homología entre las diferentes Cxs. El asa citoplásmica y los extremos amino y carboxilo presentan mayor variación en la secuencia de aminoácidos. Modificada de Söhl, et al., 2005.

### C.1.1 Nomenclatura de las conexas

A la fecha se han identificado 21 genes de Cxs en el humano y 20 en el ratón. La nomenclatura más utilizada para las Cxs es la abreviación Cx seguida por un número que corresponde a su masa molecular teórica (Goran & Willecke, 2004). En un segundo sistema las Cxs son divididas en subgrupos  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  o  $\delta$  (de acuerdo a la homología de su secuencia y la longitud del asa citoplásmica), usando el prefijo GJ (de Gap Junction) y se han numerado de acuerdo al orden de descubrimiento (Tabla 3). Por ejemplo: la Cx43 fue la primer Cx del grupo  $\alpha$  y se le llamó GJa1 (Goran & Willecke, 2004).

Tabla 3. Nomenclatura de las conexinas en el humano y el ratón

| Humano        |       | Ratón    |       |
|---------------|-------|----------|-------|
| Proteína      | Gen   | Proteína | Gen   |
| Cx43          | GJA1  | Cx43     | Gja1  |
| Cx46          | GJA3  | Cx46     | Gja3  |
| Cx37          | GJA4  | Cx37     | Gja4  |
| Cx40          | GJA5  | Cx40     | Gja5  |
| -----         | ----- | Cx33     | Gja6  |
| Cx50          | GJA8  | Cx50     | Gja8  |
| Cx59          | GJA9  | -----    | ----- |
| Cx62          | GJA10 | Cx57     | Gja10 |
| <br>          |       |          |       |
| Cx32          | GJB1  | Cx32     | Gjb1  |
| Cx26          | GJB2  | Cx26     | Gjb2  |
| Cx31          | GJB3  | Cx31     | Gjb3  |
| Cx30.3        | GJB4  | Cx30.3   | Gjb4  |
| Cx31.1        | GJB5  | Cx31.1   | Gjb5  |
| Cx30          | GJB6  | Cx30     | Gjb6  |
| Cx25          | GJB7  | -----    | ----- |
| <br>          |       |          |       |
| Cx45          | GJC1  | Cx45     | Gjc1  |
| Cx47          | GJC2  | Cx47     | Gjc2  |
| Cx30.2/Cx31.3 | GJC3  | Cx29     | Gjc3  |
| <br>          |       |          |       |
| Cx36          | GJD2  | Cx36     | Gjd2  |
| Cx31.9        | GJD3  | Cx30.2   | Gjd3  |
| Cx40.1        | GJD4  | Cx39     | Gjd4  |
| <br>          |       |          |       |
| Cx23          | GJE1  | Cx23     | Gje1  |

Tomada de Beyer, C.E. & Berthoud M.V., 2008.

### C.1.2 Las conexinas también forman hemicanales

Los hemicanales formados por seis subunidades de Cxs son conexones no acoplados, que se localizan en la membrana celular. Los estudios bioquímicos, inmunológicos y funcionales han demostrado que algunos hemicanales pueden localizarse en regiones de la membrana celular sin formar contactos célula-célula, indicando que al menos bajo ciertas condiciones algunas de estas proteínas pueden formar canales funcionales en dominios de la membrana, que no están involucrados en el contacto celular. Estos hemicanales pueden permitir la salida de moléculas citosólicas como el ATP (Anselmi, et al., 2008) y el glutamato al medio extracelular y además permiten la toma de

trazadores impermeables a la membrana como el yoduro de propidio y el amarillo de lucifer (Scemes, et al., 2009).

La caracterización de las propiedades eléctricas de los hemicanales, en células en cultivo, en condiciones de arresto, ha revelado que éstos presentan una probabilidad de apertura baja y una conductancia unitaria cercana al doble de sus canales de unión comunicante homotípicos correspondientes. Por ejemplo, la conductancia de los canales de unión comunicante formados por la Cx43 y la 45 es de alrededor de 110 y 32 pS, respectivamente, en tanto que de sus hemicanales correspondientes es de 220 y 62 pS (Sáez, et. al., 2005). Semejante a los canales de unión comunicante, la probabilidad de apertura de los hemicanales es regulada por el voltaje, así como por la acidificación intracelular y la concentración elevada de  $\text{Ca}^{2+}$  (Hu, et al., 2006; Sáez, et. al., 2010). Se ha demostrado que la probabilidad de apertura de la mayoría de los hemicanales estudiados se reduce enormemente a potenciales de membrana negativos o cuando la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular está por encima de 1 mM (Sáez, et. al., 2005).

## **C.2 Descripción general de los canales de unión comunicante**

Los canales de unión comunicante son dominios especializados en la membrana celular. Una característica estructural de estos canales es que forman conglomerados en las zonas de aposición membranal separadas por un espacio de 2-3 nm. Estos canales permiten la comunicación intercelular directa entre el citoplasma de células vecinas, dejando pasar moléculas de un tamaño de 10-14 nm de diámetro y de una masa molecular de hasta 1 kDa (Bruzzone & Ressot, 1997), como iones ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ), pequeños metabolitos (ATP), nutrientes (glucosa) y segundos mensajeros ( $\text{Ca}^{2+}$ , trisfosfato de inositol, IP3; AMP cíclico, cAMP). Pero estos canales son impermeables a moléculas más grandes como proteínas y ácidos nucleicos, así como también a organelos subcelulares (Spray, et al., 1985; Harris & Locke, 2008).

Los canales de unión comunicante estructuralmente están formados por la familia de Cxs antes descritas. Seis subunidades proteínicas de Cxs forman un conexón o hemicanal, dos hemicanales hacen contacto formando un canal intercelular y al conjunto de canales intercelulares se les denomina placa de unión comunicante (Figura 10A) (Kumar & Gilula, 1996; Bruzzone & Ressot, 1997). Mediante estudios de criofractura

se identificaron las placas de unión comunicante, las cuales forman agregados de partículas de un tamaño de 8-9 nm, como se observa en la Figura 10B (Revel & Karnovsky, 1967; Orci, et al., 1973).

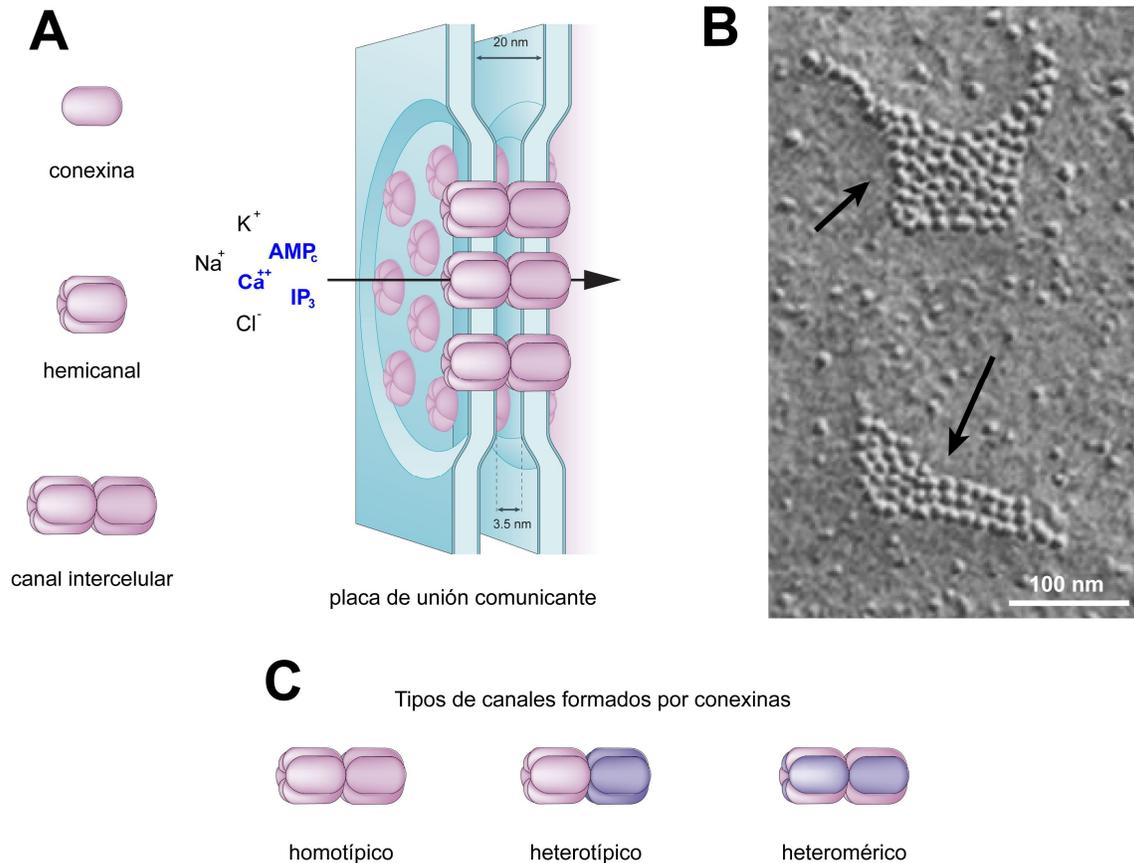


Figura 10. Estructura de los canales de unión comunicante. A) Caricatura mostrando a partir de una conexina la formación de una placa de unión comunicante. B) Criofractura de la membrana plasmática de una célula beta pancreática mostrando dos placas de unión comunicante (flechas). Tomada de Meda, et al., 1979. C) De acuerdo a su composición molecular los canales intercelulares formados por Cxs se clasifican en homotípicos, heterotípicos o heteroméricos. Imagen modificada de Söhl, et al., 2005.

Se ha reportado que la mayoría de las células expresan más de una Cx, por ejemplo en las células acinares del hígado y del páncreas exocrino se expresan la Cx32 y la Cx26. La co-expresión de múltiples genes de Cxs en una misma célula permite una composición molecular diferente en los hemicanales y los canales intercelulares. Mediante estudios de microscopía confocal se ha demostrado que puede haber más de

una Cx expresada en una placa de unión comunicante (Valiunas, et al., 2001; Gemel, et al., 2008). Los estudios eléctricos han evidenciado que existen canales de unión comunicante homotípicos en los que cada hemicanal está formado por una sola Cx, en los canales heterotípicos cada hemicanal expresa una Cx diferente y en los heteroméricos cada hemicanal contiene una mezcla de Cxs, como se muestra en la Figura 10C (Bruzzone, et al., 1996). La formación de los canales heterotípicos o heteroméricos depende de la compatibilidad de las Cxs y dicha compatibilidad está basada en la estructura de cada proteína. Ejemplos de canales de unión comunicante heteroméricos incluyen las Cx26-Cx32 en el hígado y el páncreas exocrino, las Cx46-Cx50 en la córnea y las Cx43-Cx46 en el pulmón. Sin embargo, esta compatibilidad también depende del contexto celular, por ejemplo dos proteínas compatibles, las Cx43-Cx46 forman canales heteroméricos cuando se expresan en las células epiteliales alveolares tipo I, pero no en las tipo II (Koval, 2006). Estas interacciones complejas incrementan la diversidad funcional y estructural, permitiendo un amplio arreglo de posibilidades.

### **C.2.1 Biosíntesis y degradación de los canales de unión comunicante**

Se sabe que las Cxs tienen una vida media corta, de alrededor de 5 horas (Musil, et al., 2000). Las conexinas a la vez que son traducidas se van integrando a la membrana del retículo endoplásmico. La oligomerización de seis Cxs en un hemicanal ocurre de manera progresiva y finaliza en el trans-Golgi. Posteriormente los hemicanales son transportados a la superficie celular mediante vesículas a través de los microtúbulos, los cuales se fusionan a la membrana plasmática. Estos hemicanales pueden difundir libremente a las regiones de contacto célula-célula para formar canales intercelulares. La unión entre dos conexones es a través de interacciones no covalentes entre las asas extracelulares de la Cx opuesta, cada una de las cuales contienen tres residuos de cisteína conservados que forman los puentes disulfuro intramoleculares. Finalmente estos canales se agrupan en placas de unión comunicante (Figura 11). La formación de estas placas de unión comunicante es altamente dinámica, en la que se adicionan nuevas subunidades a la periferia de la placa (Laird, 2006; Koval, 2006).

Los canales de unión comunicante que se sintetizaron primero se localizan al centro de la placa y son degradados mediante dos vías: 1) son internalizados en estructuras

vesiculares, las cuales se fusionan con los lisosomas o 2) pueden ser degradados por la vía del proteasoma (Figura 11). En la actualidad no se conoce si los hemicanales activos llegan a incorporarse en placas de unión comunicante antes de su degradación o si siguen una vía de reciclamiento distinta. La síntesis y degradación continua de las Cxs a través de estos mecanismos provee a los tejidos de una rápida adaptación, permitiéndoles cambiar de acuerdo a las condiciones fisiológicas (Laird, 2006; Hervé, et al., 2007).

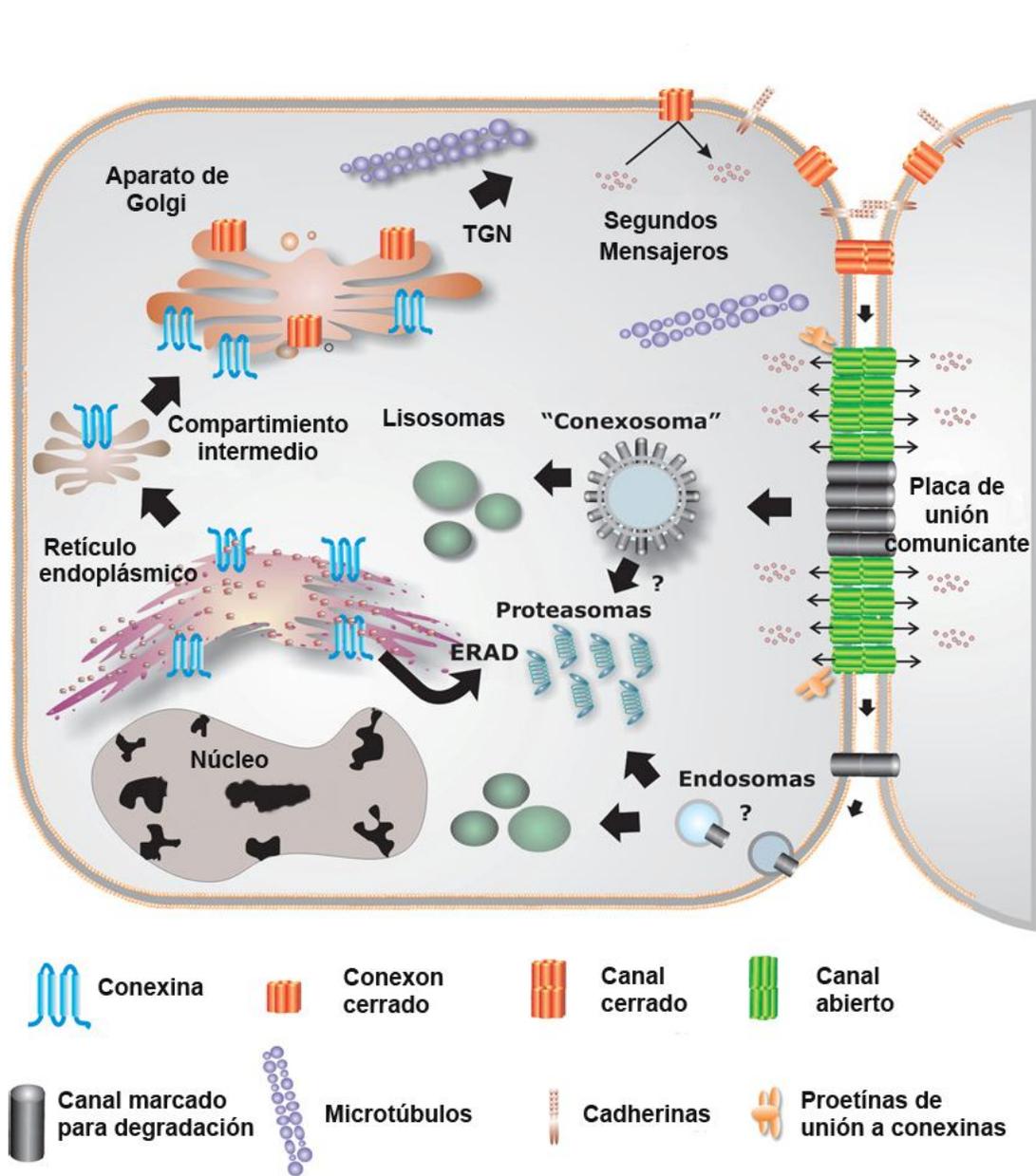


Figura 11. Imagen del ciclo de vida de las conexinas, mostrando su síntesis, tráfico hacia la membrana y degradación. Modificada de Laird, 2006.

### **C.2.2 Función de los canales de Unión Comunicante**

Se ha descrito que los canales de unión comunicante presentan un gran número de funciones, tanto en tejidos en desarrollo como en los de adulto. Dichas funciones incluyen el desarrollo embrionario adecuado y la morfogénesis, promueven la sincronización eléctrica y mecánica, median la toma de nutrientes, la transmisión de señales neuronales en las sinapsis eléctricas, controlan el crecimiento celular, la migración y la secreción (Meda, 1996; Michon, et al., 2005).

Se sabe que los canales de unión comunicante regulan la actividad eléctrica de células excitables como las neuronas, el músculo liso y el corazón, donde el acople eléctrico permite la generación de respuestas rápidas y sincronizadas (Bennett & Zukin, 2004). En tanto que en las células no excitables, como los hepatocitos o las células embrionarias, los canales de unión comunicante proveen una vía para el intercambio de metabolitos o de moléculas de señalización, jugando un papel en la propagación de la respuesta coordinada (Spray, et al., 1985; Mese, et al., 2007). Los canales de unión comunicante forman las sinapsis eléctricas, lo que ayuda a sincronizar un gran número de poblaciones de neuronas. La sincronización es crítica para los procesos cognoscitivos, incluyendo la percepción, memoria y aprendizaje.

Los canales de unión comunicante tienen un papel activo en la regulación de la función secretora de las glándulas endocrinas y exocrinas, independientemente de lo que secretan o de su mecanismo de liberación. Además, a través de la evolución las células endocrinas y exocrinas han seleccionado un patrón específico de Cxs para alcanzar su regulación (Serre-Beinier, et al., 2002). Lo anterior se evidenció a partir de experimentos en los que la Cx32 fue expresada de manera ectópica en el locus que codifica para la Cx43 o mediante la manipulación en ratones transgénicos expresando la Cx32 en las células beta (Charolais, et al., 2000), observando una función alterada de las glándulas. Lo que indica que se requiere de un patrón de Cxs específico para la secreción adecuada *in vivo*.

Un ejemplo de secreción en la que participan los canales de unión comunicante, es en las células beta secretoras de insulina. En las células beta pancreáticas inicialmente se reportó que cuando éstas se encuentran disgregadas, disminuye significativamente la secreción de insulina en respuesta a concentraciones estimuladoras de glucosa, en

comparación a las células reagregadas, en las que se han reformado sus contactos intercelulares. Por lo que se propuso que la secreción de insulina depende de los contactos célula-célula, particularmente de los canales de unión comunicante (Pipeleers, et al., 1982). Investigaciones posteriores demostraron contundentemente que las células beta pancreáticas se intercomunican a través de los canales de unión comunicante formados por la Cx36 (Serre-Beinier, et al., 2000; Moreno, et al., 2005). En modelos de ratones deficientes del gen de la Cx36, las células beta de un islote pierden la sincronización en las oscilaciones de la concentración de  $[Ca^{2+}]_i$ . También, los islotes de estos ratones presentan una pérdida de la pulsatilidad de insulina y aumenta su secreción basal (Ravier, et al., 2005). Más aún los ratones deficientes en la Cx36 son intolerantes a la glucosa (Head, et al., 2012). Lo anterior demuestra que la comunicación intercelular mediada por la Cx36 es fundamental para la regulación de la secreción de insulina de las células beta pancreáticas.

En la Tabla 4 se resume como los canales de unión comunicante tienen un papel activo en la regulación de la función secretora.

Tabla 4. Distribución de Cxs en las células secretoras de distintos órganos y glándulas.

| Conexina           | Órgano             | Células                  | Producto secretado                                |
|--------------------|--------------------|--------------------------|---|
| <b>Cx26 y Cx32</b> | Páncreas exocrino  | acinares                 | Enzimas digestivas                                |
|                    | Glándula lacrimal  | acinares                 | glicoproteínas                                    |
|                    | Glándula salival   | acinares                 | mucina  |
|                    | Hígado             | hepatocitos              | Sales biliares, colesterol                        |
|                    | Glándula mamaria   | alveolares               | Leche, Proteínas, IgGs                            |
|                    | Estómago           | parietales               | Ácido clorhídrico                                 |
| <b>Cx30</b>        | Glándula mamaria   | alveolares               | Proteínas, IgGs                                   |
| <b>Cx43</b>        | Testículo          | de Sertoli               | Péptidos  |
|                    | Ovario             | de la granulosa          | proteínas   |
|                    | Adrenal            | Células de la corteza    | Mineralocorticoides, glucocorticoides, andrógenos |
|                    | Pituitaria         | Secretoras de Prolactina | prolactina  |
|                    | Tiroides           | Células C                | calcitonina                                       |
| <b>Cx36</b>        | Páncreas endocrino | beta                     | Insulina  |
|                    | Hipotálamo         | neuronas                 | GnRH, TRH, GH, GHRH                               |
|                    | Adrenal            | cromafines               | Adrenalina, noradrenalina                         |
| <b>Cx40</b>        | riñón              | mioepiteliales           | Renina  |

Tabla modificada de Serre-Beinier, et al., 2002; Michon, et al., 2005.

Por otro lado, los canales de unión comunicante también participan en el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos, en procesos de 1) morfogénesis, 2) diferenciación celular y 3) desarrollo (Meda & Spray, 2000; Houghton, 2005). Estos canales juegan un papel crucial durante la embriogénesis permitiendo el paso de factores de desarrollo entre grupos particulares de células. La multiplicidad de expresión de Cxs durante el desarrollo y la organogénesis se han demostrado en el corazón del roedor, hígado, glándula pineal y testículo de rata, cerebro de rata y ratón, riñón y piel de ratón, así como en tejidos que derivan del ectodermo, endodermo y mesodermo de ratón (Chanson & Spray, 1995).

Un ejemplo bien documentado del papel de los canales de unión comunicante en el proceso de diferenciación, es el de la delección del gen que codifica para la Cx43 en el ratón, lo cual retarda la migración de las células de la cresta neural que contribuyen a la morfogénesis cardíaca, resultando en la obstrucción del ventrículo derecho y muerte perinatal (Reaume, et al., 1995).

Los estudios en modelos de ratones genéticamente modificados, deficientes en el gen de alguna Cx, así como de las mutaciones de las Cxs en el humano, proveen evidencias de que las alteraciones en los genes de las Cxs son críticas para el desarrollo de cierto tipo de tejidos como se muestra en la Tabla 5 (Meda & Spray, 2000; Willecke, et al., 2002).

Tabla 5. Enfermedades asociadas a alguna alteración en los genes de las conexinas

| Conexina en ratón (mCx) | Expresión principal   | Fenotipo (s) del ratón deficiente en la conexina                              | Enfermedad hereditaria en humanos                             | Conexina en humano (hCx) |
|-------------------------|---|---|---|--------------------------|
|                         | n.a.  | n.a.  | n.a.  | hCx25                    |
| mCx26                   | Cerebro, piel, coclea, hígado, placenta                             | Letal al día embrionario 11   | Pérdida del oído sensorineural, hiperqueratosis palmo plantar | hCx26                    |
| mCx29                   | Células mielinizadas  | n.a.  | n.a.  | hCx30.2                  |
| mCx30                   | Piel, cerebro, coclea   | Daño en el oído   | Pérdida del oído no sindrómica, displasia ectodermal          | hCx30                    |
| mCx30.2                 | n.a.  | n.a.  | n.a.  | hCx31.9                  |
| mCx30.3                 | piel  | n.a.  | Eritroqueratodermia variabilis                                | hCx30.3                  |
| mCx31                   | Piel, placenta  | Dismorfogénesis de la placenta transitoria                                    | Daño al oído, eritroqueratodermia variabilis                  | hCx31                    |
| mCx31.1                 | piel  | n.a.  | n.a.  | hCx31.1                  |
| mCx32                   | Hígado, células de Schwann, acinares del páncreas, oligodendrocitos | Disminución en la degradación de glucógeno, incremento en carcinoma de hígado | Neuropatía periférica hereditaria (CMTX)                      | hCx32                    |
| mCx33                   | testículo   | n.a.  |   |                          |
| mCx36                   | Neuronas, células beta pancreáticas                                 | deficit visual, intolerancia a la glucosa                                     | n.a.  | hCx36                    |
| mCx37                   | endotelio   | Esterilidad en la hembra  | n.a.  | hCx37                    |
| mCx39                   | n.a.  | n.a.  | n.a.  | hCx40.1                  |
| mCx40                   | Corazón, endotelio  | Arritmia atrial   | n.a.  | hCx40                    |
| mCx43                   | Corazón, testículo, endotelio, etc                                  | Malformación letal del corazón  | Heterotaxia viscerotaxial                                     | hCx43                    |
| mCx45                   | Corazón, músculo liso, neuronas                                     | Letal al día embrionario 10.5   | n.a.  | hCx45                    |
| mCx46                   | retina  | Catarata nuclear zonular  | Catarata congénita  | hCx46                    |
| mCx47                   | Cerebro   | n.a.  | n.a.  | hCx47                    |
| mCx50                   | retina  | Microftalmia, catarata congénita pulverulenta zonular                         | catarata pulverulenta zonular                                 | hCx50                    |
|                         |   | n.a.  | n.a.  | hCx59                    |
| mCx57                   | ovarios   | n.a.  | n.a.  | hCx62                    |

n.a. = no analizado. Modificada de Willecke, et al., 2002.

## **C.2.3 Estudio de los canales de unión comunicante**

### **C.2.3.1 Expresión exógena de cDNAs codificando para las Cxs**

El sistema de ovocitos de *Xenopus* utilizado para la expresión de los canales de unión comunicante fue experimentalmente desarrollado por Dahl en 1992, el cual consistía en inyectar el RNA exógeno codificante de alguna Cx en dos ovocitos apareados y a las 48 horas ya era posible realizar los registros eléctricos. Más tarde esta estrategia fue modificada realizando la transfección estable con plásmidos que contenían los cDNAs de Cxs en líneas celulares de mamífero immortalizadas, como HeLa, SK HEP-1, N2A (Eghbali, et al., 1990; Eckert, et al., 1993). Se ha demostrado que dichas células no expresan canales de unión comunicante o los presentan en un nivel muy bajo. Las estrategias anteriores, han permitido determinar las propiedades biofísicas de los canales de unión comunicante formados por Cxs específicas (Chanson & Spray, 1995).

### **C.2.3.2 Métodos utilizados para estudiar el acople celular vía los canales de unión comunicante**

Debido a que los canales de unión comunicante están localizados en las membranas de células opuestas, su accesibilidad para los registros electrofisiológicos es muy limitada. Por lo anterior, para determinar cómo están acopladas las células mediante estos canales de unión comunicante, se han utilizado varias aproximaciones metodológicas, como son el flujo de trazadores y los registros electrofisiológicos. Los datos funcionales que uno puede obtener de dichos estudios incluyen la permeabilidad, la conductancia y la fuerza de acople entre las células. El acople entre dos células a través de los canales de unión comunicante puede registrarse por acople químico y acople eléctrico.

#### **Acople químico con moléculas trazadoras de la vía intercelular.**

El acople intercelular también se puede evaluar midiendo el flujo intercelular de iones radiomarcados y compuestos orgánicos fluorescentes. Estos métodos consisten en la difusión de una sonda molecular marcada de una célula y la subsecuente detección en la o las células vecinas para revelar la extensión de acople dentro de los cultivos así como en tejidos intactos. Los trazadores fluorescentes son los más comúnmente empleados. En los primeros estudios los trazadores se acoplaban a fluoróforos como el isotiocianato de fluoresceína (FITC) y el isotiocianato de tetrametil rodamina (TRITC).

Más recientemente se introdujo el uso de la biocitina y la neurobiotina, las cuales son moléculas más pequeñas y móviles, que revelaron el flujo intercelular entre grupos neuronales, gracias a lo cual ahora se sabe que éstos se encuentran acoplados. La fuerza de acople puede evaluarse de una manera directa contando el número de células a las cuales se transfirió el colorante o la velocidad del paso de éste. Además, la concentración del colorante en la célula inyectada y en las células que fue transferido puede medirse como una función del tiempo y calcularse la permeabilidad (Chanson & Spray, 1995).

### **Acople eléctrico**

Para medir el acople eléctrico se ha implementado el método de doble fijación de voltaje en pares aislados de células. A cada célula del par aislado se introduce una micropipeta de vidrio con una punta de menos de una micra, formando un gigasello. Cada pipeta contiene solución salina y esta solución entra a la célula y a su vez está conectada a través de un electrodo a un amplificador de fijación de voltaje. Mediante la aplicación de presión negativa se forma un gigasello entre la pipeta y la membrana plasmática. Posteriormente, utilizando el modo de registro de configuración de célula completa, ambas células son fijadas al mismo voltaje, luego una de las células se mantiene con un voltaje fijo, mientras que la otra es depolarizada o hiperpolarizada (aplicando pulsos de voltaje transunión ( $V_j$ ), de amplitud creciente, con polaridad positiva y negativa), lo cual induce una corriente de unión ( $I_j$ ) en la célula no pulsada. Con esta metodología, es posible registrar los cambios en la magnitud y curso temporal de las corrientes macroscópicas de los canales de unión comunicante al variar la diferencia de voltaje que se aplica entre las dos células (Pérez-Armendariz, et al, 1991; Chanson & Spray, 1995). Los valores de conductancia estacionarios normalizados que se obtienen son graficados con respecto a los pulsos de voltaje aplicados a las células, para así generar curvas de conductancia-voltaje (Figura 12). Dichas curvas varían dependiendo del tipo de Cxs que forman el canal, indicando si un canal es homotípico o heterotípico.

Con esta metodología también es posible obtener el valor de conductancia eléctrica de los canales de unión comunicante. La conductancia de unión macroscópica ( $g_j$ ), se calcula con la ley de Ohm y es el cociente  $g_j = I_j/V_j$  (donde la conductancia = corriente registrada en una célula dividida por el voltaje aplicado a la otra célula del par). La

unidad de conductancia de un canal está dada en Siemens (S), en donde un S es la conductancia que presenta una resistencia de un Ohm. La conductancia de los canales de unión comunicante típicamente está en el orden de los picoSiemens (pS;  $10^{-12}$  Siemens) (Harris & Locke, 2008).

### **C.2.3.3 Modulación del cierre de los canales de unión comunicante**

Para los canales de unión comunicante no se han descrito sustancias que incrementen el estado de apertura del canal, no obstante con diversos tratamientos sí puede modularse la comunicación intercelular induciendo su cierre mediante diversas estrategias metodológicas.

Se ha descrito que la conductancia de los canales de unión comunicante puede disminuir de manera rápida (en cuestión de segundos) y reversible mediante manipulaciones experimentales como un incremento en la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  libre citoplasmático o la acidificación del pH intracelular, lo cual puede provocar el cierre de estos canales (Nicholson, 2003; Sohl & Willecke, 2004). La sensibilidad de los canales de unión comunicante al pH depende del subtipo de Cx, por ejemplo el cierre inducido por acidificación para la Cx50 presenta un valor pKa aparente de 7.0 y para la Cx32 de 6.0 (Srinivas, et al., 2001).

La mayoría de las células están acopladas con cientos de canales de unión comunicante, así que para registrar la conductancia de un solo canal, referida como conductancia unitaria ( $\gamma_j$ ), experimentalmente se puede reducir el número de canales funcionales tal que la apertura y cierre de un solo canal puede resolverse. Esto usualmente se logra utilizando fármacos, los cuales pueden inducir reversiblemente el cierre de los canales de unión comunicante. Se sabe que la mayoría de los fármacos se incorporan en la bicapa lipídica de la membrana y actúan como agentes desacoplantes de los canales de unión comunicante (Sohl & Willecke, 2004). Entre los fármacos utilizados están el heptanol, el octanol, el halotano, el ácido glicirrinético, el ácido araquidónico y la quinina o derivados de ésta. Aunque no todos los fármacos utilizados son igual de efectivos en los canales de unión comunicante, por ejemplo, la quinina cierra los canales formados por la Cx36 y la Cx50 (en células transfectadas), en una manera reversible y dependiente de la concentración, pero no bloquea los canales formados por la Cx26, Cx32, Cx40 y la Cx43 (Srinivas, et al., 2001).

### C.2.4 Propiedades biofísicas de los canales de unión comunicante

Como los canales iónicos convencionales, los canales de unión comunicante no permanecen abiertos continuamente, sino que alternan entre estados abiertos y cerrados, de manera dinámica, es decir, sufren un cambio conformacional reversible que cierra el canal en respuesta a cambios en el ambiente de la célula como el descenso de pH o un incremento en la concentración de  $[Ca^{2+}]_i$  (Nicholson, 2003; Sohl & Willecke, 2004). A continuación se describen las propiedades biofísicas de los canales de unión comunicante.

#### Conductancia

El valor de conductancia de unión macroscópica ( $G_j$ ) de los canales de unión comunicante está dado por el número de canales entre las células acopladas (el balance entre la formación y la degradación de estos canales) y por la fracción de canales abiertos (Spray, et al., 1985), tal que la  $G_j$  refleja la facilidad o la dificultad con que los iones atraviesan el lumen del canal. Sin embargo, si el número de canales de unión comunicante presentes en la membrana es elevado, pueden existir errores en la estimación de la  $G_j$ , por lo que, es recomendable realizar el registro de un canal único, lo cual se logra como mencionamos antes, mediante el uso de fármacos desacoplantes. A partir de los registros en una amplia variedad de tipos celulares, se ha observado que la conductancia unitaria ( $\gamma_j$ ) de los canales de unión comunicante formados por las diferentes Cxs varía desde los 9 hasta los 300 pS, como puede observarse en la Tabla 6 (Verselis, 2008).

Tabla 6. Conductancias unitarias registradas de canales homotípicos de cada Cx

| Conexina<br>(Cx) | Conductancia unitaria ( $\gamma_j$ )<br>En pS |
|------------------|---|
| Cx30.2           | 9   |
| Cx36             | 10-15   |
| Cx45             | 32  |
| Cx32             | 45  |
| Cx47             | 55  |
| Cx43             | 120   |
| Cx26             | 135   |
| Cx30             | 179   |
| Cx40             | 180   |
| Cx50             | 220   |
| Cx37             | 310   |

Modificada de Verselis, 2008.

## **Selectividad**

La selectividad de los canales de unión comunicante se mide como el grado de selectividad a la carga iónica, es decir, a la facilidad relativa con que los iones cargados positiva o negativamente permean los canales. La permeabilidad relativa al  $K^+$  o  $Cl^-$  es tomada como el índice de carga de selectividad. Por ejemplo, se ha reportado que la Cx30 es altamente selectiva a moléculas catiónicas, la Cx26 parece ser permeable a moléculas aniónicas y cationes, en tanto que la Cx36, Cx45, Cx46 y la Cx57 presentan una preferencia a moléculas catiónicas. Existe una larga lista de conductancias unitarias y selectividades de cargas diferentes, donde su falta de correlación sugiere que el poro del canal tiene diversas propiedades estructurales y electrostáticas (Harris & Locke, 2008).

## **Sensibilidad al voltaje.**

La sensibilidad al voltaje, también denominada dependencia al voltaje ha sido descrita para un vasto número de Cxs y se ha encontrado que la mayoría de los canales de unión comunicante son dependientes al voltaje, como se muestra en la Figura 12 (Qu & Dahl, 2002), con la excepción de la Cx30.2.

Se sabe que los canales de unión comunicante se cierran cuando existe una diferencia de potencial entre las células, sin embargo, el cierre es solo parcial. Para la mayoría de las Cxs una gran diferencia de potencial reduce la conductancia de unión, en aproximadamente el 30-50% de la conductancia máxima. Semejante a otros canales de membrana, los canales de unión comunicante exhiben estados de subconductancia. Para los canales formados por algunas Cxs, la probabilidad de que el canal resida en el estado de subconductancia se incrementa por un gradiente de voltaje. Se ha propuesto que en el estado de subconductancia los canales presentan una permeabilidad selectiva diferente a la del estado de conductancia total, tal que el flujo de moléculas de mayor tamaño se reduce. De lo anterior, se ha propuesto que el papel fisiológico del voltaje en los canales de unión comunicante, es restringir selectivamente el paso de moléculas más grandes entre las células (Qu & Dahl, 2002).

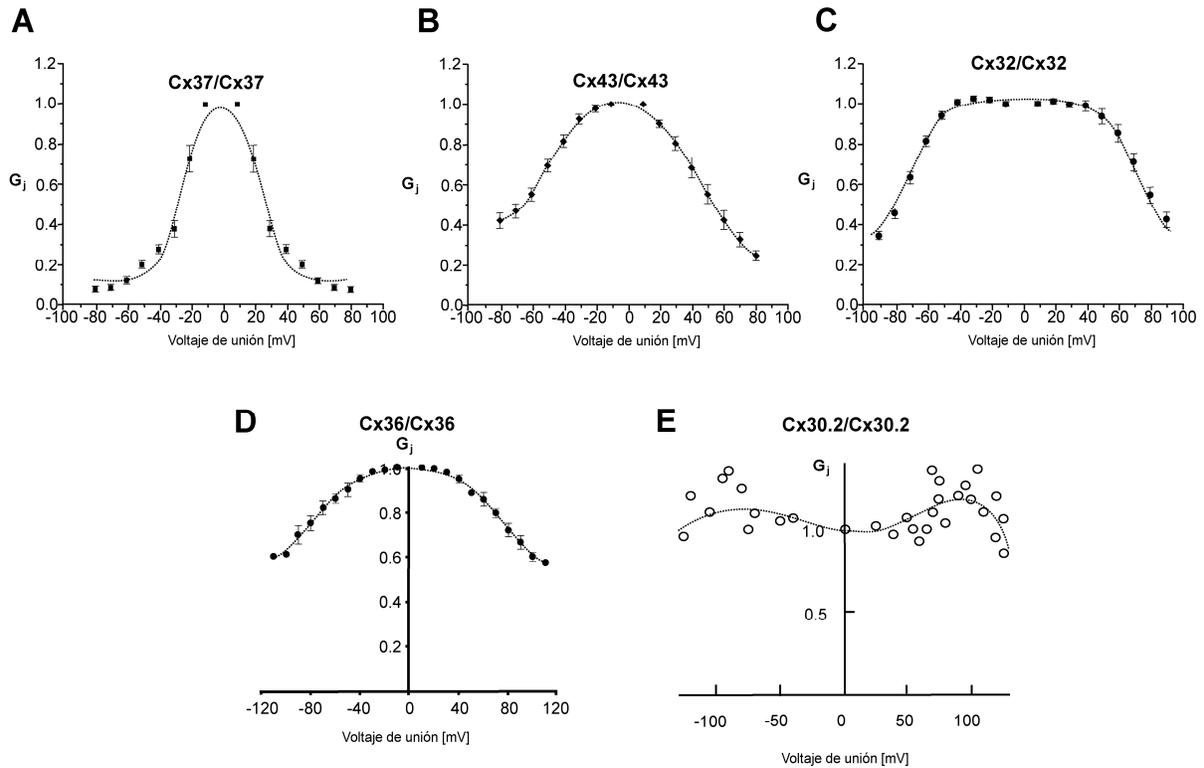


Figura 12. Dependencia al voltaje de los canales de unión comunicante homotípicos. A-C) Canales expresados en ovocitos de *Xenopus*. D) canales formados por la Cx36 expresados en células N2A. E) canales formados por la Cx30.2 en células HeLa. La sensibilidad al voltaje de los canales de unión comunicante se muestra de A-E, de mayor a menor sensibilidad.

### C.3 Propiedades eléctricas de los canales de unión comunicante formados por la Cx30.2

La proteína de la Cx30.2 está formada por 278 residuos de aminoácidos, con un peso molecular de 30.2 kDa. Ésta presenta en el dominio carboxilo citoplásmico tres sitios susceptibles de fosforilación; dos sitios conservados para la proteína cinasa C (PKC) en los residuos 234/252, 271/287 y un sitio conservado para la caseína cinasa II en los residuos 256/272. El análisis del transcrito de la Cx30.2 mediante técnicas de RT-PCR y Northern blot demostró que la Cx30.2 se expresa de manera ubicua en diferentes tejidos, entre éstos, los vasos sanguíneos en el testículo y en la retina, donde forma canales de unión comunicante en estos tejidos (Nielsen & Kumar, 2003; Manasson, et al., 2013).

En cuanto a las propiedades biofísicas de los canales de unión comunicante formados por la Cx30.2, los estudios realizados en células HeLa transfectadas con ésta Cx han

mostrado que los canales homotípicos formados por la Cx30.2 presentan una conductancia unitaria de 9 pS (de las más pequeñas registradas actualmente, ver Tabla 6). En tanto que sus canales no exhiben sensibilidad al voltaje como se muestra en la Figura 12E (Kreuzberg, et al, 2005).

Además, se sabe que la Cx30.2 también forma hemicanales funcionales en condiciones de registro fisiológicas. Estudios en células HeLa transfectadas con el cDNA de la Cx30.2 revelaron una mayor permeabilidad membranal al flujo de moléculas fluorescentes como DAPI, en comparación a las células HeLa control. La  $\gamma_j$  de los hemicanales de esta Cx es de aproximadamente 20 pS, cerca del doble de conductancia que presentan los canales de unión comunicante homotípicos formados por esta misma Cx (Bukauskas, et al, 2006).

#### **C.4 Propiedades eléctricas de los canales de unión comunicante formados por la Cx36**

La Cx36 es una proteína formada por 321 residuos de aminoácidos, con una asa citoplasmática larga de 99 residuos de aminoácidos y con una región carboxilo citoplasmática corta que contiene sitios potenciales de reconocimiento para la caseína cinasa I y II, proteína cinasa dependiente de cAMP y una proteína cinasa dependiente de calmodulina (Condorelli, et al., 1998).

Las propiedades biofísicas de la Cx36 fueron analizadas en células transfectadas N2A y PC12, detectando una  $\gamma_j$  de 10-15 pS, (de las más pequeñas de la familia de las Cxs, Tabla 6). La relación entre la  $g_j$  y el voltaje de unión indican que la Cx36 presenta una débil sensibilidad al voltaje (Figura 12D) (Srinivas, et al., 1999). Consistentemente las propiedades electrofisiológicas antes mencionadas son semejantes en neuronas del hipocampo que expresan ésta Cx *in vivo* y en células HeLa transfectadas con la Cx36 (Srinivas, et al., 1999; Teubner, et al., 2000).

Debido a que en adelante se hará referencia a las propiedades eléctricas de los canales de unión comunicante formados por la Cx30.2 y la Cx36, en sistemas de expresión *in vitro*, en la Tabla 7 se resumen dichas propiedades.

Tabla 7. Propiedades biofísicas de los canales de unión comunicante homotípicos formados por la Cx30.2 y la Cx36

| <b>Pares de células<br/>Estudiadas</b>   | <b>Conductancia<br/>unitaria (<math>\gamma_j</math>)</b> | <b>Sensibilidad al voltaje<br/>% pares de células</b> | <b>Sensibilidad<br/>a quinina</b> |
|--|--|---|-----------------------------------|
| <b>HeLa Transfectadas con<br/>Cx30.2</b><br>Kreuzberg, et al., 2005              | 7-9 pS   | 100 % insensibles<br>( $V_o = 0$ )                    | ND                                |
| <b>Transfectadas con Cx36</b><br>Srinivas, et al., 1999<br>Teubner, et al., 2000 | 10-15 pS   | 100% sensibles<br>( $V_o = +/-75$ )                   | Si ( $EC_{50} = 35$<br>$\mu M$ )  |

Corrientes de unión registradas de pares de células, utilizando el método de doble fijación de voltaje.

ND = No determinado aún.  $V_o$  = valor de voltaje al cual se inactivan el 50% de los canales de unión comunicante.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha demostrado ampliamente que los canales de unión comunicante regulan la comunicación intercelular entre las células beta pancreáticas y que estos canales tienen un papel fundamental en la secreción de la insulina. Actualmente se ha demostrado que de las 20 Cxs descritas, la Cx36 es la única que intercomunica a las células beta en los islotes de Langerhans.

Al registrar las propiedades eléctricas de los canales de unión comunicante en pares aislados de células beta recién disociados encontraron que: 1) la  $\gamma_j$  fue de 5-10 pS; 2) solo en el 45% de los pares de células los canales de unión comunicante mostraron una débil sensibilidad al voltaje y en el 55% restante no hubo sensibilidad al voltaje; 3) las corrientes de los canales no fueron afectadas con quinina, incluso a una concentración de 1 mM.

Mientras que los canales de unión comunicante homotípicos formados por la Cx36 en células deficientemente acopladas y transfectadas con dicha Cx presentan una  $\gamma_j$  de 10-15 pS, en el 100% de los pares de células los canales son débilmente sensibles al voltaje y son sensibles a quinina ( $EC_{50}$  35  $\mu$ M).

Lo anterior demuestra que las propiedades biofísicas de los canales de unión comunicante entre las células beta pancreáticas fueron semejantes, pero no idénticas a las descritas para los canales formados por la Cx36 en células transfectadas con esta Cx. Las diferencias biofísicas antes mencionadas sugieren que las células beta pancreáticas expresan canales de unión comunicante formados por otra Cx, además de la Cx36 (Moreno et al., 2005).

De los canales de unión comunicante homotípicos, estudiados hasta ahora, los de la Cx30.2 presentan características biofísicas semejantes a las de los canales que intercomunican a las células beta pancreáticas (Tabla 7). Por lo anterior, en el presente proyecto investigamos si las células beta pancreáticas de ratón expresan canales de unión comunicante formados por la Cx30.2.

### **3. HIPÓTESIS**

Las células beta pancreáticas de ratón también expresan canales de unión comunicante formados por la Cx30.2.

### **4. OBJETIVO GENERAL**

Demostrar que la Cx30.2 forma canales de unión comunicante en las células beta pancreáticas de ratón.

#### **4.1. OBJETIVOS PARTICULARES:**

1. Investigar si el transcrito de la Cx30.2 se expresa en los islotes pancreáticos de ratón.
2. Evaluar la distribución celular específica de la Cx30.2 en los islotes pancreáticos.
3. Estudiar si la Cx30.2 co-localiza con la Cx36 en zonas de aposición membranal en las células beta pancreáticas.
4. Explorar si la Cx30.2 se expresa en la vasculatura de los islotes de Langerhans.
5. Determinar si la expresión del transcrito de la Cx30.2 es modulada por glucosa en los islotes de Langerhans.

## **5. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **5.1 Modelo animal**

Se utilizaron ratones machos, de la cepa CD1, de 3 meses de edad, los cuales fueron mantenidos en el bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM, bajo ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y con libre acceso a alimento y agua. Los ratones fueron tratados de acuerdo al cuidado y uso de los animales de laboratorio indicados en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Los ratones una vez fuera del bioterio, fueron sacrificados inmediatamente por dislocación cervical. Se realizaron las disecciones del páncreas y testículo, para ser utilizados en los diferentes protocolos experimentales.

### **5.2 RT-PCR de la Cx30.2 en islotes de Langerhans y testículo**

El RNA del tejido de testículo de ratón se aisló mediante el método de trizol (Invitrogen, CA, USA) y el RNA de los islotes fue aislado utilizando las columnas RNeasy Mini kit (Qiagen, Valencia, USA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La calidad del RNA íntegro fue observada en un gel de agarosa al 1%, demostrando la presencia de las bandas 28S y 18S ribosomal. La pureza del RNA se probó mediante espectrofotometría, las muestras con una A260/280 igual o mayor a 1.8 fueron incluidas. Las muestras de RNA fueron tratadas con DNasa I (Invitrogen, CA, USA), a fin de eliminar remanentes de DNA genómico. El RNA de los islotes y de las muestras de testículo se reversotranscribió utilizando el kit SuperScript III First-Strand Synthesis Supermix for qRT-PCR (Invitrogen, CA, USA). Brevemente; en un volumen final de 20  $\mu$ l, 1  $\mu$ g de RNA se mezcló con 10  $\mu$ l de buffer de reacción y 2  $\mu$ l de la mezcla de enzimas reverso transcriptasa y Taq polimerasa. Se uso un termociclador GeneAmp PCR System 9700, el programa de ciclaje utilizado fue de 25 °C por 10 min, 50 °C por 30 min y 85 °C por 5 min. Al final las muestras se incubaron con RNasa H a 37 °C por 20 min. Como un control para verificar la calidad del cDNA sintetizado se realizó un PCR de punto final amplificando el gen de expresión constitutiva GAPDH. El RT-PCR se realizó utilizando la sonda Taqman para la Cx30.2 (Mm00731344s1, Applied Biosystem) como se describe en el punto 5.10.

### **5.3 Detección de la Cx30.2 por western blot en islotes de Langerhans**

Se obtuvieron homogenados de proteínas totales de aproximadamente 500 islotes de Langerhans y de testículo de ratón adulto utilizando un buffer RIPA (20-188, Millipore, MA, USA), al cual se adicionaron inhibidores de proteasas (P8340, Sigma, St. Louis, MO). Las proteínas se cuantificaron por el método de Bradford. 50 µg de homogenados de proteínas se separaron en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes. Las proteínas se transfirieron a una membrana de Polifluoruro de vinilideno (PVDF; Millipore, MA, USA). Posteriormente la membrana se bloqueó con leche descremada al 2%. Se realizaron lavados con TBS. La membrana se incubó toda la noche a 4 °C con el anticuerpo policlonal anti-Cx30.2 (1:100, Invitrogen, CA, USA). Se realizaron lavados con TBS y se incubó con anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo acoplado a la enzima peroxisa de rabano (HRP) (1:5000, Invitrogen, CA, USA). La detección de la proteína se realizó mediante quimioluminiscencia (SuperSignal West Pico, Pierce, Milwaukee, WI, USA).

### **5.4 Detección de la Cx30.2 en islotes de Langerhans por inmunohistoquímica**

Los fragmentos del páncreas fueron fijados en paraformaldehído al 4% por 24 horas, éstos se incluyeron en parafina y se cortaron secciones de 3 µm de espesor, los cuales se colocaron en portaobjetos tratados con poli-L-lisina. La exposición al antígeno se realizó incubando las laminillas en buffer de citratos (pH 6.0) a 120 °C por 3 min, posteriormente se realizaron lavados con PBS. Se bloqueó la peroxidasa endógena durante 10 min con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% (J.T.Baker, Phillipsburg NJ, USA). Las secciones seriadas se incubaron toda la noche a 4 °C con el anticuerpo anti-Cx30.2 (1:50) o anti-Cx36 (1:50, Invitrogen, CA, USA) o anti-insulina (1:1000, Invitrogen, CA, USA). Se lavaron las secciones y se incubaron durante 1 hora a 37 °C con el anticuerpo secundario unido a la enzima HRP (Zymed, San Francisco, California, USA). La inmunoreactividad se visualizó incubando la sección con 3, 3'-diaminobenzidina (Zymed, San Francisco, California, USA). El control negativo se analizó omitiendo el anticuerpo primario. Las secciones fueron teñidas con hematoxilina-eosina. Finalmente las imágenes se adquirieron utilizando un microscopio Nikon, modelo eclipse *i*, Japan.

### **5.5 Inmunofluorescencia de la Cx30.2 en secciones de páncreas y células beta cultivadas**

Se fijó el páncreas de ratón con etanol al 70% durante 20 min y las células beta se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 15 min, posteriormente se incubó con solución bloqueadora (SFB 2%, BSA 2%, tritón 1%) durante 30 min. Luego las secciones se co-incubaron durante toda la noche a 4 °C con los anticuerpos anti-Cx30.2 (1:100) y monoclonal anti-Cx36 (1:100) o anti-Cx30.2 y monoclonal anti-CD31 (1:500, BD Pharmingen, San Diego, USA). Por otro lado las células beta cultivadas se co-incubaron con los anticuerpos anti-Cx30.2 (1:100) y anti-insulina (1:100). Posteriormente las secciones fueron lavadas con PBS e incubadas con su anticuerpo secundario correspondiente, acoplado a FITC o TRITC. Las secciones finalmente fueron incubadas con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, 1:1000; Invitrogen, CA, USA), durante 1 minuto para marcar los núcleos. Como control negativo las secciones fueron incubadas solo con el anticuerpo secundario correspondiente. Las imágenes se adquirieron utilizando un microscopio confocal Olympus, modelo FV1000, Japan. Se realizaron al menos siete experimentos independientes en las secciones pancreáticas provenientes de 4 ratones.

### **5.6 Aislamiento de islotes de Langerhans**

Los islotes de Langerhans se obtuvieron de ratones de la cepa CD1 a través de la técnica de disociación mediante colagenasa previamente descrita por Lacy y Kostianovsky en 1967. Brevemente; los páncreas de 4 ratones fueron disecados, cortados finamente con tijeras e incubados durante 20 min en una solución de colagenasa P a una concentración de 3 mg/ml (Roche) disuelta en 2 ml de buffer Krebs, con albúmina de suero bovino (BSA) al 3%. Luego los islotes fueron lavados tres veces con buffer Krebs y colectados mecánicamente con una pipeta Pasteur utilizando un microscopio estereoscópico.

### **5.7 Cultivo de islotes de Langerhans incubados con glucosa**

Los islotes de Langerhans aislados (como en el punto 5.6) se incubaron para su recuperación durante toda la noche en medio DMEM (GIBCO), suplementado con suero bovino fetal (SFB) al 10%, penicilina 100 U/ml, estreptomycinina 100 µg/ml y glucosa 11 mM a 37 °C en un ambiente con CO<sub>2</sub> al 5%. Posteriormente los islotes fueron expuestos durante 24 horas en medio DMEM con glucosa 3.3 o 22 mM e incubados a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5%.

### **5.8 Cultivo de células beta pancreáticas**

Los islotes de Langerhans aislados (como en el punto 5.6) fueron disociados en un protocolo de dos pasos: se incubaron durante 10 min a 37 °C en una solución con glucosa 16 mM, EGTA 3 mM, BSA al 3%, seguida por 3 min de incubación en una solución libre de Ca<sup>2+</sup> con glucosa 16 mM, BSA al 3% y papaína 0.2 U/ml. Luego las células fueron disgregadas mecánicamente por trituración con una pipeta Pasteur. Se realizaron lavados y las células disociadas fueron sembradas sobre cubreobjetos e incubadas toda la noche en medio RPMI con glucosa 11 o 22 mM y suplementado con SFB 10%, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5%.

### **5.9 Aislamiento de RNA y síntesis de cDNA de islotes de Langerhans**

Se reunieron grupos de cerca de 450 islotes provenientes de 12 páncreas de ratón para cada condición de glucosa 3.3 o 22 mM. De estos islotes el RNA se aisló mediante las columnas de RNeasy Mini kit (Qiagen, Valencia, USA). El RNA se trató con DNasa I y se reversotranscribió como en el punto 5.2.

### **5.10 RT-PCR de tiempo real (qRT-PCR) de islotes incubados con glucosa**

La expresión de los genes se cuantificó mediante RT-PCR de tiempo real utilizando las sondas Taqman (Applied Biosystem): Cx30.2 (Mm00731344s1), Cx36 (Mm00439121m1) y gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH, Mm99999915g1). El cDNA de 5 diferentes grupos de islotes se exploró en reacciones por duplicado, en un volumen final de 20 µl, el cual incluyó 100 ng de cDNA, 10 µl de buffer TaqMan Universal (Applied Biosystems), 1 µl de sonda TaqMan 20X y 7 µl de agua libre de RNAsas. Como control negativo en cada corrida de qRT-PCR se incluyeron reacciones con agua en lugar de cDNA. La cuantificación del mRNA se realizó en un equipo 7500 real time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, USA), el programa de ciclaje fue de: 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C, y 45 ciclos consistiendo de 30 segundos a 95 °C y 1 min a 62 °C. El análisis de los genes se realizó con curvas estándar relativas para cada gen, construidas a partir de diluciones seriadas (500 a 0.05 ng) de cDNA de islotes recién aislados. Los valores relativos del transcrito se obtuvieron interpolando los valores de fluorescencia con las curvas de calibración. La expresión de los genes se normalizó respecto al gen constitutivo GAPDH.

### **5.11 Análisis estadístico del qRT-PCR**

Los valores presentados de la cuantificación del qRT-PCR fueron el promedio  $\pm$  el error estándar. Las diferencias estadísticas entre los grupos de islotes tratados con glucosa 3.3 y 22 mM de glucosa se probaron con la *t* de Student utilizando el programa SigmaPlot 11.0®. Los datos fueron considerados como significativos a una  $P < 0.05$ .

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Expresión del transcrito y la proteína de la Cx30.2 en los islotes de Langerhans

Para investigar si el transcrito de la Cx30.2 se expresa en las células beta pancreáticas, inicialmente realizamos estudios de RT-PCR a partir de preparaciones de islotes de Langerhans y de testículo, este último se usó como control positivo (Nielsen & Kumar, 2003). Encontramos un amplificado de 84 pb en ambos tejidos, del tamaño esperado, de acuerdo al diseño de la sonda Taqman utilizada para la Cx30.2 (Figura 13A).

Posteriormente, con el objetivo de precisar si en los islotes el transcrito de la Cx30.2 se traduce a proteína se realizaron experimentos de western blot, donde detectamos una banda de cerca de 30 kDa, correspondiente al peso esperado para esta conexina, en homogenados de preparaciones de páncreas total, de islotes de Langerhans (Figura 13B panel superior e inferior, respectivamente) y de testículo (Figura 13B).

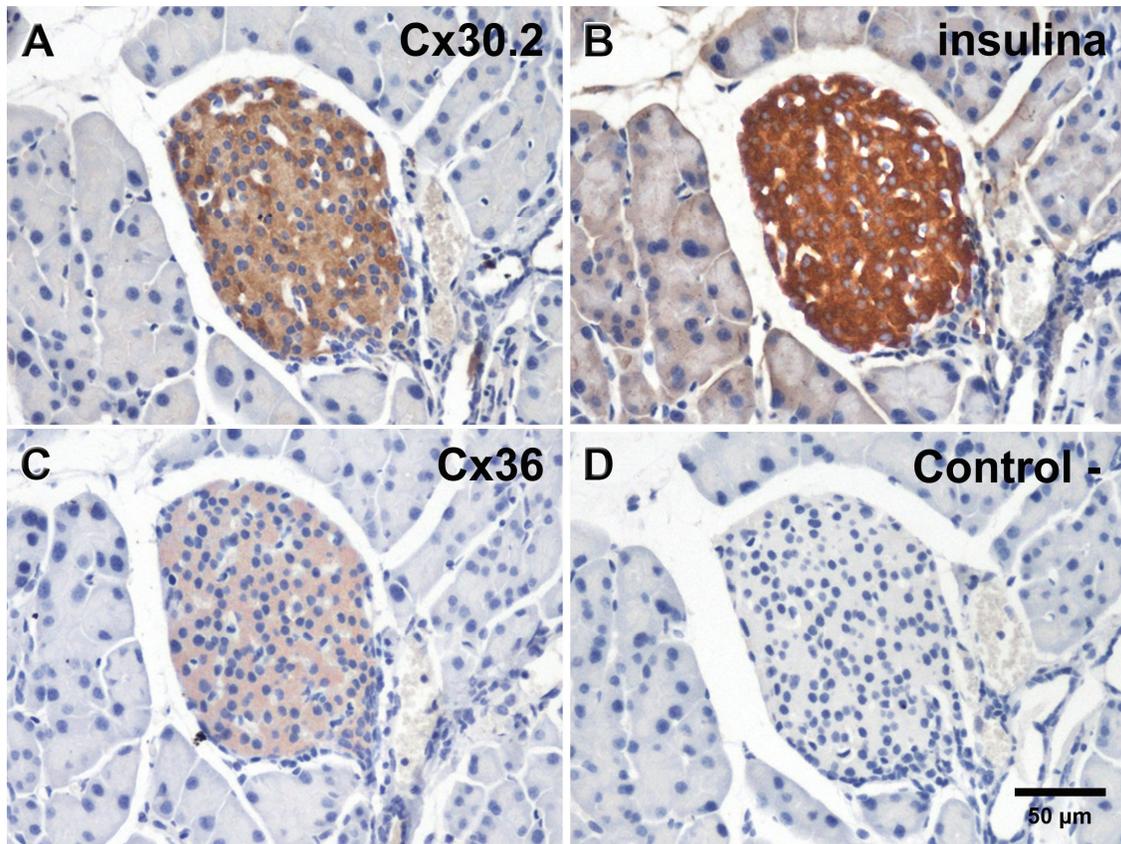


**Figura 13. Expresión del transcrito y la proteína de la Cx30.2 en islotes de Langerhans de ratón.** A) El análisis de RT-PCR mostró una banda del peso esperado para la Cx30.2, de 84 pb en islotes aislados (I) y en testículo (T), pero no se detectó ninguna banda en la reacción en la cual se substituyó el cDNA por agua (C-). B) Análisis de western blot, donde se detectó una banda de 30 kDa en homogenados de páncreas total (P), islotes (I) y testículo (T).

### 6.2 Distribución celular de la Cx30.2 en los islotes de Langerhans

A fin de investigar la distribución celular de la proteína de la Cx30.2 en los islotes de Langerhans, realizamos estudios de inmunohistoquímica. En las secciones seriadas de páncreas de ratón adulto, observamos una tinción positiva para la Cx30.2 en las células beta pancreáticas (Figura 14A). Lo anterior puede observarse a partir de la tinción en las secciones seriadas positivas para la insulina (Figura 14B) y para la Cx36 (Figura 14C),

los cuales son marcadores específicos de las células beta pancreáticas. Además, no observamos marca de Cxs, ni de insulina en el tejido exocrino, así como tampoco en el control negativo (en el cual las secciones fueron incubadas solo con anticuerpo secundario, Figura 14D), lo cual demuestra la especificidad de los anticuerpos utilizados.



**Figura 14.** La proteína de la Cx30.2 se expresa en las células beta pancreáticas de ratón. Las secciones pancreáticas de 3 µm de espesor fueron procesadas mediante inmunohistoquímica. A) La Cx30.2 se expresa en las células beta positivas a la insulina (B) y a la Cx36 (C). D) No se detectó ninguna señal en el control negativo (sección incubada sin anticuerpo primario). n=10 experimentos independientes.

### 6.3 La Cx30.2 co-localiza con la Cx36 en las células beta pancreáticas

Posteriormente, para investigar la distribución sub-celular precisa de la Cx30.2 en las células beta pancreáticas, se realizaron estudios de inmunofluorescencia, en criosecciones de páncreas de ratón adulto, las secciones fueron doblemente marcadas con los anticuerpos contra la Cx30.2 y la Cx36, el núcleo se tiñó con DAPI. El análisis

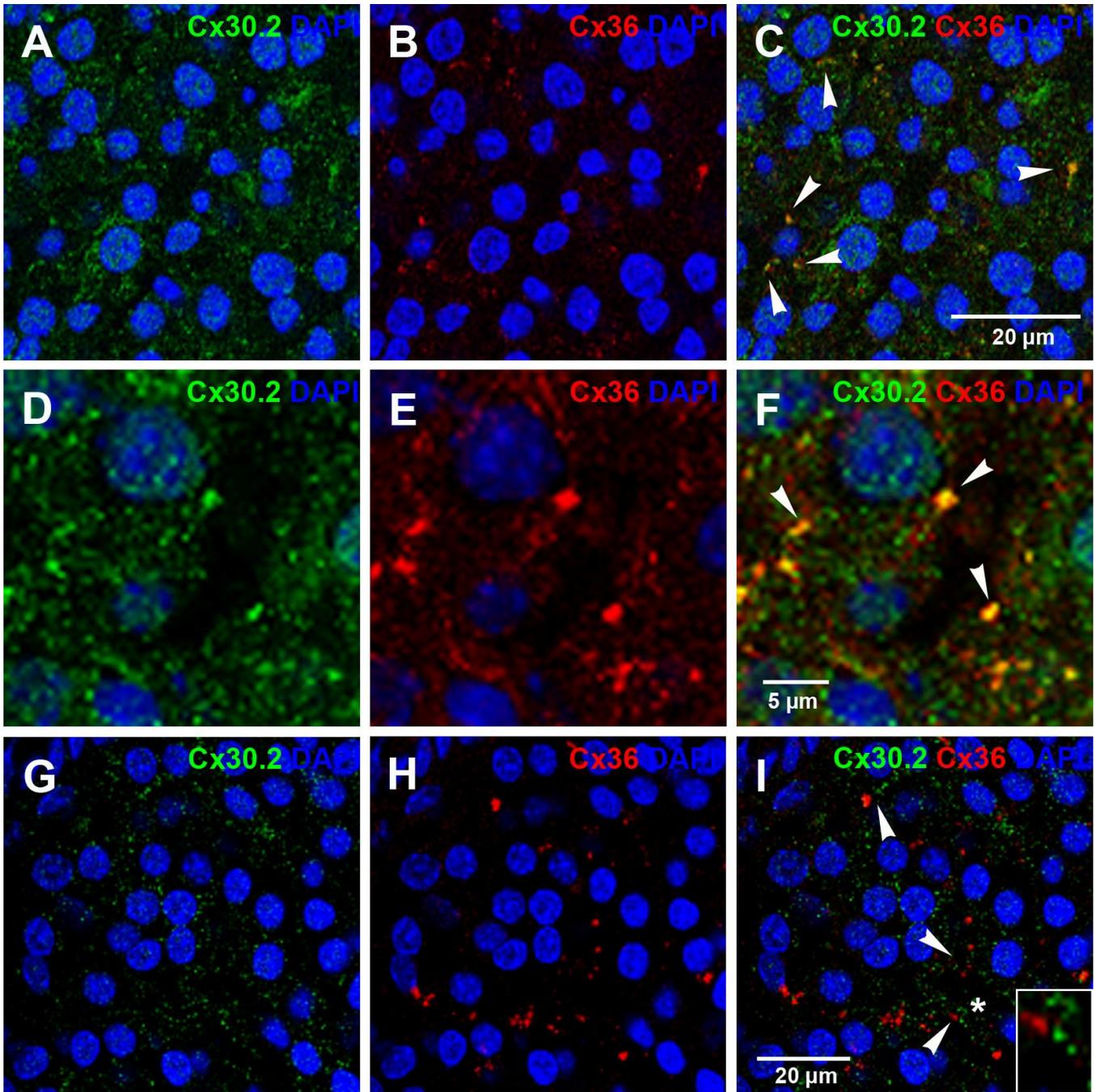
de las secciones del páncreas se realizó mediante microscopía confocal en cortes ópticos de 1  $\mu\text{m}$  de espesor.

En el 100% de los islotes estudiados (de alrededor de 10 páncreas) se encontró una marca de la Cx30.2, como un fino puntilleo fluorescente abundante, en el citoplasma de las células beta (Figura 15A, D y G). Las células beta pancreáticas se identificaron porque fueron positivas para la Cx36 (Figura 15B, E y H).

Además, en el 71% de los islotes analizados, la señal fluorescente de la Cx30.2, se encontró en zonas de aposición membranal en las células beta, es decir, formando contactos célula-célula (marca verde, Figura 15A, D). Esta distribución en la membrana de la marca de la Cx30.2 se encontró con un patrón espacial muy semejante al de la Cx36 (marca roja, Figura 15B, E), dicha relación espacial se demuestra en la imagen en la que se sobreponen ambas fluorescencias resultando en amarillo (flechas en la Figura 15C, F). Lo anterior indica que la Cx30.2 y la Cx36 co-localizan en la membrana de las células beta pancreáticas, formando canales de unión comunicante.

Por otro lado, en otros islotes también se detectó la marca positiva de la Cx30.2 en zonas de contacto célula-célula (Figura 15G), en regiones adyacentes a la Cx36 (Figura 15H), en las cuales a pesar de tener un patrón de tinción semejante ambas señales no co-localizan, (Figura 15I, asterisco), como se muestra a mayor amplificación (Figura 15I, inserto).

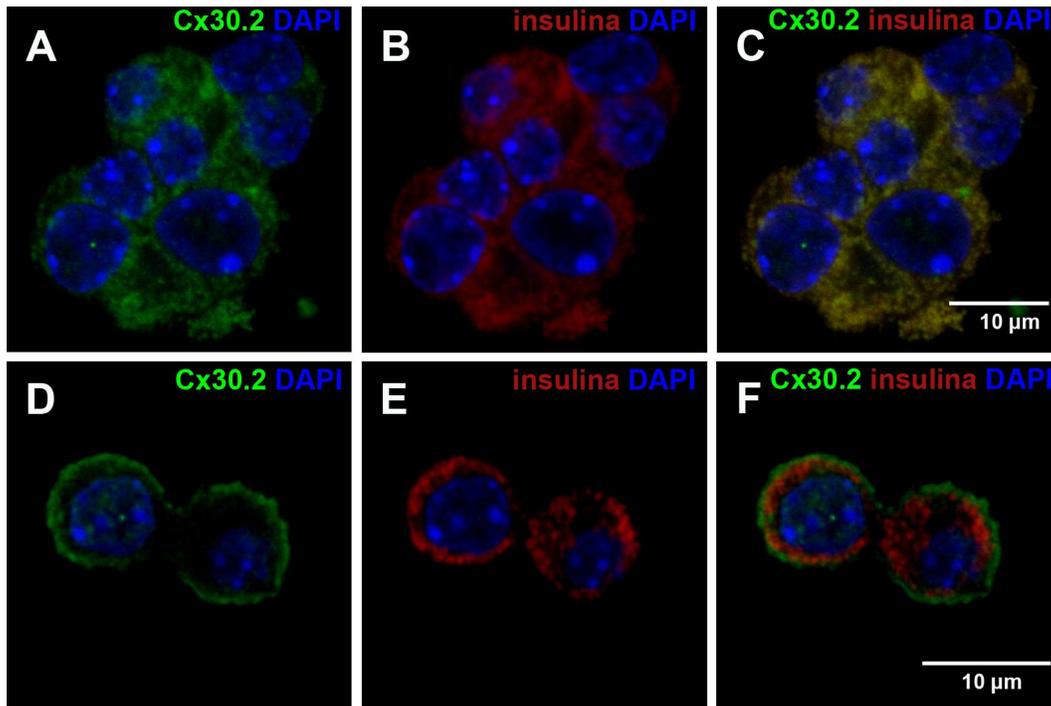
En resumen, la Cx30.2 se encontró en las células beta pancreáticas con dos localizaciones celulares distintas: 1) un fino puntilleo en el citoplasma de las células beta y 2) un puntilleo de mayor tamaño en la membrana de las células beta, en zonas de contacto célula-célula, que indica que la Cx30.2 forma placas de unión comunicante. Algunas de éstas placas co-localizan con las placas de unión comunicante de la Cx36 (amarillo, Figura 15F) y algunas no (verde, Figura 15I).



**Figura 15. La Cx30.2 se expresa en el citoplasma y en la membrana de las células beta pancreáticas.** Criosecciones de páncreas de ratón fueron doblemente marcadas con anticuerpos anti-Cx30.2 (verde) y anti-Cx36 (rojo) y los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Se muestran tres islotes diferentes: 1, A-C; 2, D-F; 3, G-I. Se identificó una fuerte señal de la Cx30.2 en un patrón de puntilleo en el citoplasma y en zonas de contacto célula-célula (A, D y G). La reactividad de la Cx30.2 co-localizó en la misma zona de contacto con la Cx36 (C y F, flechas). La marca de la Cx30.2 en algunos islotes alterna con la de la Cx36 (I, inserto).

La distribución subcelular de la proteína de la Cx30.2 también se estudió en cultivos de células beta, expuestas a concentraciones estimuladoras de glucosa (11 y 22 mM), a partir de los cuales se realizaron experimentos de inmunofluorescencia co-incubando con anticuerpos contra la Cx30.2 y la insulina. En el análisis realizado por microscopía confocal a dichas células, se encontró que la proteína de la Cx30.2 se localiza en el citoplasma (Figura 16A), igual que la insulina (Figura 16B), esto se ilustra mejor en la Figura 16C, en la cual co-localizan ambas marcas (amarillo). Este resultado es consistente con la marca positiva de la Cx30.2 observada en las secciones del páncreas, confirmando que la Cx30.2 se expresa en el citoplasma de las células beta pancreáticas.

Adicionalmente, en algunos pares de células beta o en grupos de éstas, encontramos la marca de la Cx30.2 a lo largo de la membrana celular (Figura 16D), pero no en zonas de contacto célula-célula (ya que la marca no se observa como un puntilleo). Lo anterior se demuestra en la sobreposición de las fluorescencias de la Cx30.2 y la insulina (Figura 16F).

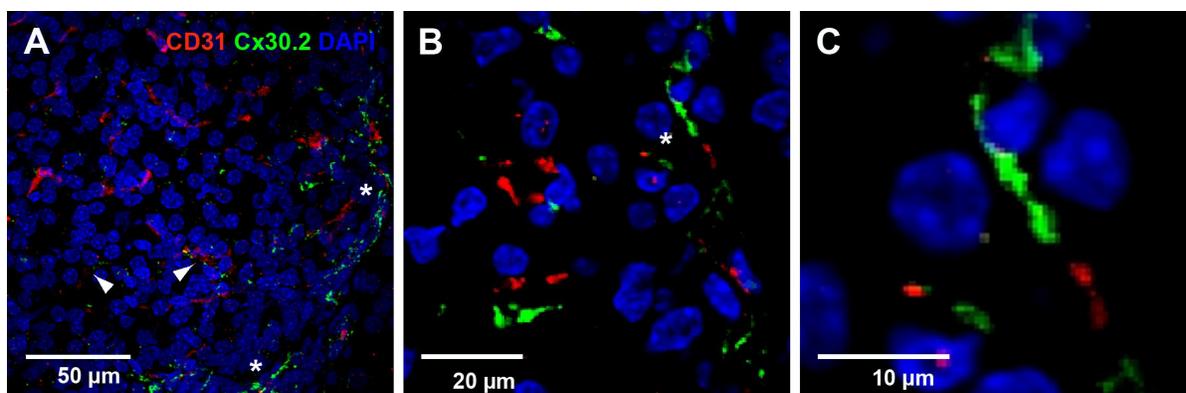


**Figura 16. La Cx30.2 también se expresa en el citoplasma y en la membrana de las células beta en cultivo.** A-F) Imágenes de cortes ópticos de 1 μm de espesor de cultivos de células beta expuestas a 22 mM de glucosa, co-incubadas con anticuerpos anti-Cx30.2 (verde) y anti-insulina (rojo). La Cx30.2 se localizó en el citoplasma de las células beta (A, C) y en algunas células se encontró fuertemente polarizada a la membrana celular (D, F).

#### 6.4 Expresión de la Cx30.2 en áreas de contacto intercelular en las células endoteliales de los vasos sanguíneos de los islotes

Se ha reportado previamente que la Cx30.2 forma canales de unión comunicante en los vasos sanguíneos de testículo de ratón (Nielsen & Kumar, 2003) y en las células endoteliales de la retina de rata (Manasson, et al., 2013). De ahí que en el presente estudio investigamos si la Cx30.2 se expresa en los vasos sanguíneos de los islotes de Langerhans. Para ello se marcaron doblemente criosecciones de páncreas de ratón con anticuerpos contra la Cx30.2 y CD31 (un marcador membranal de las células endoteliales), el cual se encuentra en toda la vasculatura (Lindsay, et al., 2006).

Se encontró que la Cx30.2 se localiza en los vasos sanguíneos de los islotes, tanto de la periferia, como de la región central (verde, Figura 17A, asterisco y puntas de flecha, respectivamente). A una mayor amplificación se observó que la Cx30.2 se localiza en zonas de aposición membranal (Figura 17B, asterisco), y en la Figura 17C se muestra que la Cx30.2 se distribuye adyacente a la marca del CD31 (rojo), indicando que se localiza en zonas de contacto célula-célula.

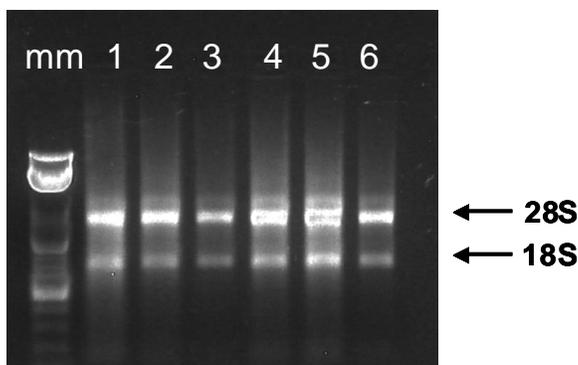


**Figura 17. Expresión de la Cx30.2 en la membrana de las células endoteliales vasculares de los islotes.** Las secciones pancreáticas se marcaron con anticuerpos contra la Cx30.2 (verde) y el marcador endotelial CD31 (rojo), los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Se detectó que la Cx30.2 se expresa en las células endoteliales de los islotes (A, flechas), específicamente en zonas de contacto membranal en estas células, indicadas por la señal CD31 positiva, como se muestra a mayor amplificación (B). C) Un mayor aumento de la región marcada con asterisco en B, en donde se muestra que la Cx30.2 se localiza adyacente a CD31.

### 6.5 Modulación del transcrito de la Cx30.2 por glucosa en islotes de Langerhans

Previamente se describió que el transcrito de la Cx36 es regulado a la baja en islotes de rata incubados con una concentración elevada de glucosa (20 mM), durante 24 horas (Allagnat, et al., 2005). De ahí que en el presente estudio investigamos si el transcrito de la Cx30.2 también se modula por altas concentraciones de glucosa en islotes de Langerhans de ratón.

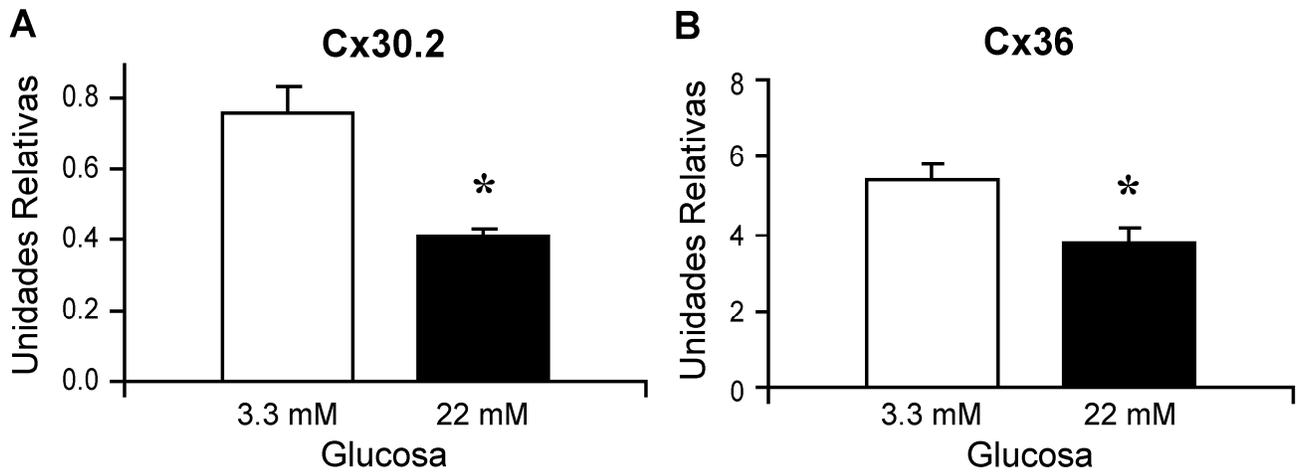
Se aisló el RNA de grupos de islotes expuestos durante 24 horas con baja (3.3 mM) y alta (22 mM) concentración de glucosa. Como primer término se verificó la calidad del RNA, encontrando una buena integridad de éste, como se muestra en la Figura 18.



**Figura 18. Integridad del RNA aislado de islotes incubados con glucosa.** Gel de agarosa representativo mostrando las bandas de RNA ribosomal 28S y 18S, las cuales indican la buena preservación del RNA aislado de islotes expuestos a 3.3 mM (pozos 1-3) y 22 mM de glucosa (pozos 4-6). mm= marcador molecular.

Una vez que se observó que el RNA aislado de los islotes incubados con glucosa fue de buena calidad, se procedió a la síntesis del cDNA y mediante estudios de qRT-PCR se evaluó el cambio en la expresión del mRNA de la Cx30.2 y de la Cx36.

Se encontró que el transcrito de la Cx30.2 disminuyó en un 45% en los islotes de ratón incubados con 22 mM de glucosa en comparación con 3.3 mM (Figura 19A). Mientras que el mRNA de la Cx36 disminuyó en un 31% con la concentración elevada de glucosa (Figura 19B), semejante a la disminución previamente reportada del 40% en islotes de rata incubados durante 24 horas con 20 mM de glucosa (Allagnat, et al., 2005). La regulación a la baja de ambas Cxs fue estadísticamente significativa  $P < 0.05$ .



**Figura 19.** Los niveles de mRNA de la Cx30.2 se modulan dependiendo de la concentración de glucosa. El análisis cuantitativo mediante qRT-PCR de islotes incubados durante 24 horas con 3.3 mM o 22 mM de glucosa mostró que el transcrito de la Cx30.2 decreció en un 45% (A) en la condición elevada de glucosa en comparación con 3.3 mM, en tanto que la Cx36 disminuyó en un 31% (B). Los transcritos fueron normalizados con el gen de expresión constitutiva GAPDH. Los datos presentados son el promedio  $\pm$  el error estándar,  $n = 5$  grupos de islotes para cada condición experimental. \*  $P < 0.05$ .

## 7. DISCUSIÓN

En la presente investigación demostramos por primera vez que la Cx30.2 se expresa en las células beta pancreáticas de ratón, en diferentes localizaciones celulares, las cuales serán discutidas.

La localización abundante de la Cx30.2 en el citoplasma de las células beta del islote observada en las secciones pancreáticas fue confirmada en cultivos de células beta. A este respecto, cabe mencionar que de acuerdo al tráfico de proteínas de membrana, la señal de la Cx30.2 en el citoplasma celular es consistente con la síntesis de las Cxs en el retículo endoplásmico y su transporte por la vía vesicular (Laird, 2006). Otra posibilidad que podría explicar la localización de la Cx30.2 en el citoplasma es que ésta tiene sitios potenciales de fosforilación para la PKC (Nielsen & Kumar, 2003) y se ha descrito que las Cxs que forman los canales de unión comunicante, una vez fosforiladas son internalizadas al citoplasma para su degradación (Laird, 2005). En cualquier caso, ambas posibilidades son compatibles con el ciclo de vida de las Cxs (Laird, 2006).

Por otra parte, mediante los resultados de inmunofluorescencia documentamos que la señal fluorescente de la Cx30.2 y la Cx36 co-localizan en las células beta pancreáticas (Figura 15F), indicando que ambas Cxs co-existen en la misma placa de unión comunicante. Lo anterior soporta la hipótesis de que los canales de unión comunicante entre las células beta pancreáticas son heteroméricos (Moreno, et al., 2005). La detección del puntillado fluorescente de la Cx30.2 (verde), adyacente al de la Cx36 (rojo) (Figura 15I, inserto), sugiere que la Cx30.2 también forma canales de unión comunicante homotípicos en las células beta. Como se dijo antes, la Cx30.2 es la única Cx que no presenta dependencia al voltaje, por lo tanto la existencia de canales homotípicos de la Cx30.2 explicaría el 55% de los pares de células beta, en los que sus canales de unión comunicante no mostraron dependencia al voltaje.

Sin embargo, en los ratones deficientes en la Cx36 se ha demostrado que la sincronía en la actividad eléctrica y de calcio intracelular en las diferentes regiones de un islote dependen críticamente de la Cx36 (Ravier, et al., 2005) y que las células beta pancreáticas de dichos animales no se encuentran eléctricamente acopladas, ni se han

detectado placas de unión comunicante que pudieran estar formadas por alguna otra Cx. La falta de detección de las placas de unión comunicante de la Cx30.2 en las células beta pancreáticas puede explicarse de diferentes maneras: 1) si las mediciones de acople eléctrico no fueron optimizadas; 2) dado que las placas de unión comunicante de las células beta son muy pequeñas, es fácil no detectarlas, más aún si el número de placas de la Cx30.2 es reducido con respecto a la Cx36 y 3) otra posibilidad es que la distribución de la Cx30.2 en las células beta dependa de la expresión de la Cx36.

Más aún, en los cultivos de las células beta no se detectó la clásica marca de los canales de unión comunicante, como puntilleo entre las membranas de células adyacentes, pero si se observó una intensa reactividad de la marca de la Cx30.2 a lo largo de la membrana (Figura 16F). Esta marca de fluorescencia continua a lo largo de la membrana celular ha sido previamente reportada para describir hemicanales (Liang, et al., 2011). Este resultado sugiere que la Cx30.2 puede formar hemicanales en las células beta pancreáticas, lo cual no es extraño ya que se sabe que ésta Cx forma hemicanales en sistemas de expresión *in vitro* (Bukauskas, et al., 2006).

Por otra parte, la Cx30.2 se ha descrito en la membrana de los vasos sanguíneos de testículo (Nielsen & Kumar, 2003) y de la retina (Manasson, et al., 2013). En este trabajo describimos por primera vez, la distribución de la Cx30.2 en zonas de aposición membranal de las células endoteliales vasculares de los islotes de Langerhans; lo cual es fisiológicamente relevante, por que los canales de unión comunicante son un mecanismo importante en la coordinación de la respuesta vascular para regular la distribución del flujo sanguíneo, la resistencia vascular periférica, así como los cambios en el diámetro de los vasos sanguíneos (Figueroa & Duling, 2009; Johnstone, et al., 2009).

Se ha descrito la expresión de la Cx30.2 en las células endoteliales de la retina de rata y en cultivos primarios de éstas células incubadas con una concentración elevada de glucosa (30 mM), donde la proteína de la Cx30.2 disminuyó en un 69%. También se ha documentado que la expresión de la Cx30.2 se encuentra disminuida en los capilares de la retina de ratas diabéticas respecto a las ratas control (Manasson, et al., 2013). En este trabajo documentamos que la Cx30.2 se localiza en la membrana de las células beta y de las células endoteliales vasculares de los islotes, dos tipos de células que se encuentra

bien descrito están íntimamente asociadas en los islotes (Richards, et al., 2010). De ahí que la disminución en el mRNA de la Cx30.2 observada en los islotes incubados con glucosa 22 mM que detectamos, puede resultar de la disminución de esta Cx en las células beta y/o endoteliales de los islotes. Futuras investigaciones podrán discernir entre estas posibilidades.

Finalmente, se requiere de estudios futuros para investigar el papel funcional de la Cx30.2 en las células beta pancreáticas, así como en las endoteliales de los vasos sanguíneos de los islotes pancreáticos.

## **8. CONCLUSIÓN**

Dado que hasta antes de este trabajo existía la idea de que la Cx36 era la única conexina expresada en las células beta pancreáticas, los hallazgos aquí presentados, contribuyen en forma original al campo en la comprensión del papel de las uniones comunicantes en la regulación de la función de las células beta.

La co-expresión de la Cx30.2 y la Cx36 en placas de unión comunicante en las células beta pancreáticas, aunada al hecho de que la transcripción de la Cx30.2 se modula por glucosa en cultivos de islotes de Langerhans, sugieren que la Cx30.2 participa en la regulación de la secreción de insulina en las células beta.

## 9. REFERENCIAS

Allagnat, F., Martin, D., Condorelli, F.D., Waeber, G. and Haefliger, A.J. 2005. Glucose represses connexin36 in insulin-secreting cells. *J. Cell Sci.* 118: 5335-5344.

Anselmi, F., Hernandez, H.V., Crispino, G., Seydel, A., Ortolano, S., Roper, D.S., Kessaris, N., Richardson, W., Rickheit, G., Filippov, A.M., Monyer, H. and Mammano, F. 2008. ATP release through connexin hemichannels and gap junction transfer of second messengers propagate  $Ca^{2+}$  signals across the inner ear. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105 (48): 18770-18775.

Atwater, I., Kukuljan, M. and Pérez-Armendariz, E.M. 1994. Molecular biology of the ion channels in the pancreatic  $\beta$ -cell. En *Molecular Biology Diabetes, Part I*. Eds. Draznin and D. LeRoith. Humana Press, Inc., Totowa, NJ.

Bennet, M.V. and Zukin, R.S. 2004. Electrical coupling and neuronal synchronization in the mammalian brain. *Neuron.* 41 (4): 494-511.

Bertram, R., Sherman, A. and Satin, L. S. 2007. Metabolic and electrical oscillations: partners in controlling pulsatile insulin secretion. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293: E890-E900.

Beyer, C.E. and Berthoud M.V., 2008. The Family of Connexin Genes. En *connexins a guide*. Eds. Harris L. A. and Locke D. Humana Press, Springer Science. New York, USA.

Brisova, M. and Powers, A.C. 2008. Architecture of Pancreatic Islets. En *Pancreatic Beta Cell in Health and Disease*. Eds. Seino, S. and Bell G.I. Springer, Japan.

Bruzzone, R. and Ressot, C. 1997. Connexins, gap junctions, and cell-cell signaling in the nervous system. *Eur. J. Neurosci.* 9: 1- 6.

Bruzzone, R., White, T.W. and Paul, D.L. 1996. Connections with connexins; the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur. J. Biochem.* 238: 1-27.

Bukauskas, F., Kreuzberg, M., Rackauskas, M., Bukauskiene, A., Bennett, M., Verselis, V. and Willecke, K. 2006. Properties of mouse connexin 30.2 and human connexin 31.9 hemichannels: Implications for atrioventricular conduction in the heart. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103 (25): 9726-9731.

Chanson, M. and Spray, D.C. 1995. Electrophysiology of gap junctional conductance. En: *Pacemaker Activity and Intercellular Communication*. Ed. Huizinga JD. CRC Press, Inc. p51-72.

Charollais, A., Gjinovci, A., Huarte, J., Bauquis, J., Nadal, A., Martín, F., Andreu, E., Sánchez-Andrés, J.V., Calabrese, A., Bosco, D., Soria, B., Wollheim, C.B., Herrera, P.L. and 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.

Condorelli, D.F., Parenti, R., Spinella, F., Trovato S.A., Belluardo, N., Cardile, V. and Cicirata, F. 1998. Cloning of a new gap junction gene (Cx36) highly expressed in mammalian brain neurons. *Eur. J. Neurosci.* 10: 1202-1208.

Cryer, P.E. 2001. Glucose homeostasis and hypoglycemia. En *The Endocrine Pancreas and Regulation of Metabolism*. Eds. Jefferson, L.S. and Cherrington, A.D. *Handbook of Physiology*. New York, Oxford University Press.

Dahl, G. 1992. The *Xenopus oocyte* cell-cell channel assay for functional analysis of gap junction proteins. En *Cell-Cell Interactions: A Practical Approach*. Eds. Stevenson, B. R., Gallin, W. J., and Paul, D. L. Oxford University Press, New York.

Eckert, R., Dzarlieva-Barkowskaya, A. and Hülser, D.F. 1993. Biophysical characterization of gap junction channels in HeLa cells. *Pflügers Arch.* 205: 404-407.

Eghbali, B., Kessler, J.A. and Spray, D.C. 1990. Expression of gap junction channels in communication-incompetent cells after stable transfection with cDNA encoding connexin32. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 1328-1331.

Figuroa, F.X. and Duling, R.B. 2009. Gap Junctions in the Control of Vascular Function. *Antioxidants redox signaling.* 11 (2): 251-266.

Fraser, P.A. and Henderson, J.R. 1980. The arrangement of endocrine and exocrine pancreatic microcirculation observed in the living rabbit. *Quarterly J. Exp. Physiol.* 65: 151-158.

Gemel, J., Lin, X., Collins, R., Veenstra, R.D. and Beyer, E.C. 2008. Cx30.2 can form heteromeric gap junction channels with other cardiac connexins. *Biochem Biophys Res Commun.* 369 (2): 388-94.

Gerich, J.E. 2000. Physiology of glucose homeostasis. *Diabetes obes. Metab.* 2: 345-350.

Goran, S. and Willecke, K. 2004. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovascular Res.* 62: 228-232.

Grodski, G.M. 2003. Cinética de la secreción de insulina. En *Diabetes Mellitus, Fundamentos y clínica. Parte I secreción de insulina*. Eds. LeRoith, D., Taylor, S.I. and Olefski, J.M. McGraw Hill.

Hadley, M.E. 2000. *Pancreatic Hormones and Metabolic Regulation*. En *Endocrinology*. Ed. Corey, P.F. Prentice Hall, USA.

Harris A.L. and Locke D. 2008. *Permeability of Connexin Channels En connexins a guide*. Eds. Harris L. A. and I Locke D. Humana Press, Springer Science. New York, USA.

Head, W.S., Orseth, M.L., Nunemaker, C.S., Satin, L.S., Piston, D.W. and Benninger, R.K. 2012. Connexin-36 gap junctions regulate in vivo first- and second-phase insulin secretion dynamics and glucose tolerance in the conscious mouse. *Diabetes*. 61: 1700-1707.

Henderson, J.R. and Daniel, P.M. 1979. A Comparative Study of the Portal Vessels Connecting the Endocrine and Exocrine Pancreas, with a Discussion of Some Functional Implications. *Quarterly J. Exp. Physiol*. 64: 267-275.

Henderson, J.R. and Moss, M.C. 1985. A morphometric study of the endocrine and exocrine capillaries of the pancreas. *Quarterly Journal of Experimental Physiology*. 70: 347-356.

Hervé, J.C., Bourmeyster, N., Sarrouilhe, D. and Duffy H. S. 2007. Gap junctional complexes: From partners to functions. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 94: 29-65.

Houghton, F.D. 2005. Role of gap junctions during early embryo development. *Reproduction*. 129: 129-135.

Hu, X., Ma, M. and Dahl G. 2006. Conductance of Connexin Hemichannels Segregates with the First Transmembrane Segment. *Biophys. J*. 90: 140–150.

Johnstone, S., Isakson, B. and Locke, D. 2009. Biological and biophysical properties of vascular connexin channels. *Int. Rev. Cell Mol. Biol*. 278: 69-118.

Kalwat, M.A. and Thurmond, D.C. 2013. Signaling mechanisms of glucose-induced F-actin remodeling in pancreatic islet  $\beta$  cells. *Exp. Molecular Medicine*. doi:10.1038/emm.2013.73

- Kanno, T., Göpel, S.O., Rorsman, P. and Wakui, M. 2002. Cellular function in multicellular system for hormone-secretion: electrophysiological aspect of studies on  $\alpha$ -,  $\beta$  and  $\delta$ -cells of the pancreatic islet. *Neurosci. Res.* 42: 79-90.
- Kelly, C., McClenaghan, H.N. and Flatt, R.P. 2011. Role of islet structure and cellular interactions in the control of insulin secretion. *Islets.* 3 (2): 41-47.
- Koval, M. 2006. Pathways and control of connexin oligomerization. *Trends in Cell Biol.* 16 (3): 159-66.
- Kreuzberg, M.M., Goran, S., Jung-Sun, K., Verselis, V.K., Willecke, K. and Bukauskas, F.F. 2005. Functional properties of Mouse connexin 30.2 expressed in the conduction system of the Heart. *Circulation Res.* 96: 1169-1177.
- Kumar, N.M. and Gilula, N.B. 1996. The gap junction communication channel. *Cell.* 84: 381-388.
- Lacy, P.E. and Kostianovsky, M. 1967. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes.* 16 (1): 35-9.
- Laird, W.D. 2005. Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction internalization and degradation. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1711: 172-182.
- Laird, W.D. 2006. Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem. J.* 394: 527-543.
- Leibiger, I. B., Leibiger, B. and Berggren, P. 2008. Insulin Signaling in the Pancreatic  $\beta$ -Cell. *Annu. Rev. Nutr.* 28: 2.1-2.19.
- Lewis, M.P.N., Reber, H.A. and Ashley, S.W. 1998. Pancreatic blood flow and its role in the pathophysiology of pancreatitis. *J. Surgical Res.* 75: 81-89.
- Liang, W.G., Su, C.C., Nian, J.H., Chiang, A.S., Li, S.Y. and Yang, J.J. 2011. Human Connexin30.2/31.3 (GJC3) does not Form Functional Gap Junction Channels but Causes Enhanced ATP Release in HeLa Cells. *Cell Biochem. Biophys.* 61: 189-197.
- Lindsay, T.H., Halvorson, K.G., Peters, C.M., Ghilardi, J.R., Kuskowski, M.A., Wong, G.Y. and Mantyh, P.W. 2006. A quantitative analysis of the sensory and sympathetic innervation of the mouse pancreas. *Neuroscience.* 137: 1417-1426.

- Manasson, J., Tien, T., Moore, C. Kumar, N.M. and Roy, S. 2013. High glucose-induced downregulation of connexin 30.2 promotes retinal vascular lesions: implications for diabetic retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54: 2361-2366.
- Meda, P., Perrelet, A. and Orci L. 1979. Increase of gap junctions between pancreatic  $\beta$ -cells during stimulation of insulin secretion. *J. Cell Biol.* 82: 441-448.
- Meda, P. 1996. Gap junction involvement in secretion: the pancreas experience. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 23: 1053-1057.
- Meda, P. and Spray, D.C. 2000. Gap junction function. *Adv. Mol. Cell Biol.* 20: 263-322.
- Meissner, H.P. 1976. Electrophysiological evidence for coupling between B cells of pancreatic islets. *Nature.* 262: 502-504.
- Mese, G., Richard, G. and White TW. 2007. Gap junctions: basic structure and function. *J. Invest. Dermatol.* 127: 2516-24.
- Michon, L., Nlend, N.R., Bavamian, S., Bischoff, L., Boucard, N., Caille, D., Cancela, J., Charolais, A., Charpantier, E., Klee, P., Peyrou, M., Populaire, C., Zulianello, L. and Meda, P. 2005. Involvement of gap junctional communication in secretion. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1719: 82-101.
- Moreno, P.A., Berthourd, M.V., Pérez, P.G. and Pérez-Armendariz, E.M. 2005. Biophysical evidence that connexin-36 forms functional gap junction channels between pancreatic mouse  $\beta$ -cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 288: E948-E956.
- Musil, L.S., Le, A.C., VanSlyke, J.K. and Roberts, L.M. 2000. Regulation of connexin degradation as a mechanism to increase gap junction assembly and function. *J Biol. Chem.* 275: 25207-15.
- Nicholson, J.B. 2003. Gap junctions – from cell to molecule. *J. Cell Sci.* 116: 4479-4481.
- Nielsen, A. and Kumar, N.M. 2003. Differences in expression patterns between mouse connexin-30.2 (Cx30.2) and its putative human orthologue, connexin-31.9. *FEBS. Letters.* 540: 151-156.
- Orci, L., Unger, R.H. and Renold, A.E. 1973. Structural coupling between pancreatic islet cells. *Experientia.* 29: 1015-1018.

Pérez-Armendariz, E.M. and Atwater, I. 1986. Glucose-evoked changes in  $[K^+]$  and  $[Ca^{2+}]$  in the intercellular spaces of the mouse islet of Langerhans. *Adv. Exp. Med. Biol.* 211: 31-51.

Perez-Armendariz, E.M., Roy, C., Spray, D.C. and Bennett, M.V.L. 1991. Biophysical properties of gap junctions between freshly dispersed pairs of mouse pancreatic beta cells. *Biophys. J. Biophysical Society.* 59: 76-92.

Pérez-Armendariz, E.M., Atwater, I. and Bennett, M.V.L. 1995. Mechanism for fast communication within a single islet of Langerhans. En: *Pacemaker Activity and Intercellular Communication*. Ed. Huizinga, J.D. Boca Ratón, CRC Press. p.305-321.

Pipeleers, D., In't Veld, P., Maes, E. and Van de Winkel, M. 1982. Glucose-induced insulin release depends on functional cooperation between islet cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 7322-7325.

Pipeleers, D. 1987. The biosociology of pancreatic B cells. *Diabetologia.* 30: 277-291.

Qu, Y. and Dahl, G. 2002. Function of the voltage gate of gap junction channels: Selective exclusion of molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99 (2): 697-702.

Ravier, A.M., Guldenagel, M., Charolais, A., Gjinovci, A., Caille, D., Sohl, G., Wollheim, B.C., Willecke, K., Henquin, J.C. and 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.

Reaume, A.G., de Sousa, P.A., Kulkarni, S., Langille, B.L., Zhu, D., Davies, T.C., Juneja, S.C., Kidder, G.M. and Rossant, J. 1995. Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science.* 267: 1831-1834.

Revel, J.P. and Karnovsky, M.J. 1967. Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J. Cell Biol.* 33: C7-C12.

Richards, O.C. Raines, S.M. and Attie, A.D. 2010. The role of blood vessels, endothelial cells, and vascular pericytes in insulin secretion and peripheral insulin action, *Endocr. Rev.* 31: 343-363.

Rodríguez-Díaz, R., Dando, R., Jacques-Silva1, C.M., Fachado, A., Molina, J., Abdulreda, H.M., Ricordi, C., Roper, D.S., Berggren, O.P. and Caicedo, A. 2011. Alpha cells secrete acetylcholine as a non-neuronal paracrine signal priming beta cell function in humans. *Nat. Medicine.* 17 (7): 888-893.

- Rosario, L.M., Atwater, I. and Scott, A.M. 1986. Pulsatile insulin release and electrical activity from single ob/ob mouse islets of Langerhans. *Adv. Exp. Med. Biol.* 211: 413-425.
- Sáez, C.J., Retamal, A.M., Basilio, D., Bukauskas, F.F. and Bennett, V.L. M. 2005. Connexin-based gap junction hemichannels: Gating mechanisms. *Bioch. Biophys. Acta.* 1711: 215-224.
- Sáez, J. C., Schalper, K. A., Retamal, M. A., Orellana, J. A., Shoji, K. F. and Bennett, M. V. L. 2010. Cell membrane permeabilization via connexin hemichannels in living and dying cells. *Exp. Cell Res.* 316: 2377-2389.
- Santos, R.M., Rosario, L.M., Nadal, A., Garcia-Sánchez, J., Soria, B. and Valdeolmillos, M. 1991. Widespread synchronous  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations due to bursting electrical activity in single pancreatic islets. *Pflugers Arch.* 418: 417-422.
- Scemes, E., Spray, D. C. and Meda, P. 2009. Connexins, pannexins, innexins: novel roles of “hemi-channels”. *Pflugers Arch-Eur J Physiol.* 457: 1207-1226.
- Serre-Beinier, V., Le Gurun, S., Belluardo, N., Trovato-Salinaro, A., Charollais, A., Haefliger, J.A., Condorelli, D. and Meda, P. 2000. Cx36 preferentially connects  $\beta$ -cells within pancreatic islets. *Diabetes* 49: 727-734.
- Serre-Beinier, V., Mas, C., Calfbrese, A., Caton, D., Bauquis, J., Caile, A., Charolais, A., Cirulli, V. and Meda, P. 2002. Connexins and secretion. *Biol. Cell.* 94: 477-492.
- Söhl, G., Maxeiner, S. and Willecke, K. 2005. Expression and functions of neuronal gap junctions. *Nat. Rev. Neurosci.* 6 (3): 191-200.
- Spray, D.C., White, R.L., Mazet, F. and Bennett, M.V.L. 1985. Regulation of gap junctional conductance. *Am. J. Physiol.* 248: H753-H764.
- Srinivas, M., Rozental, R., Kojima, T., Dermietzel, R., Mehler, M., Condorelli, D.F., Kessler, J.A. and Spray, D. 1999. Functional Properties of Channels Formed by the Neuronal Gap Junction Protein Connexin36. *The Journal of Neuroscience.* 19 (22): 9848–9855.
- Srinivas, M., Hopperstad, M.G. and Spray, D. 2001. Quinine blocks specific gap junction channel subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98 (19): 10942-10947.
- Stagner, J.L. and Samols, E. 1992. The vascular order of islet cellular perfusion in the human pancreas. *Diabetes.* 41: 93-97.

Sohl, G. and Willecke, K. 2004. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc. Res.* 62: 228-232.

Söhl G, Maxeiner S. and Willecke, K. 2005. Expression and functions of neuronal gap junctions. *Nat. Rev. Neurosci.* 6 (3): 191-200.

Teubner, B., Degen, J., Söhl, G., Güldenagel, M., Bukauskas, F., Trexler, E.B., Verselis, V.K., De Zeeuw, C.I., Lee, C.G., Kozak, C.A., Petrasch-Parwez, E., Dermietzel, R. and Willecke, K. 2000. Functional Expression of the Murine Connexin 36 Gene Coding for a Neuron-Specific Gap Junctional Protein. *J. Membrane Biol.* 176: 249-262.

Valiunas, V., Gemel, J., Brink, R.P. and Beyer, C.E. 2001. Gap junction channels formed by coexpressed connexin40 and connexin43. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 281: H1675-H1689.

Verselis, V.K. 2008. The Connexin Channel Pore: Pore-Lining Segments and Residues. *En Connexins a Guide*. Eds. Harris L. A. and Locke D. Humana Press, Springer Science. New York, USA.

Wayland, H. 1997. Microcirculation in pancreatic function. *Microsc. Res. Tech.* 37 (5-6): 418-33.

Willecke, K., Eiberger, J., Degen, J., Eckardt, D., Romualdi, A., Güldenagel, M., Deutsch, U. and Söhl, G. 2002. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol. Chem.* 383: 725-737.

Yamada, T. and Katagiri, H. 2007. Avenues of communication between the brain and tissues/organs involved in energy homeostasis. *Endocrine J.* 54 (4): 497-505.

## **10. ANEXO**



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ybbrc](http://www.elsevier.com/locate/ybbrc)

## Connexin 30.2 is expressed in mouse pancreatic beta cells<sup>☆</sup>



C. Coronel-Cruz<sup>a,b</sup>, B. Hernández-Tellez<sup>b</sup>, R. López-Vancell<sup>a</sup>, Y. López-Vidal<sup>c</sup>, J. Berumen<sup>a,d</sup>, A. Castell<sup>b</sup>, E.M. Pérez-Armendariz<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Unidad de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México, D.F. 04510, México and Hospital General de México, México, D.F. 06726, Mexico

<sup>b</sup> Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM, México, D.F. 04510, Mexico

<sup>c</sup> Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM, México, D.F. 04510, Mexico

<sup>d</sup> Unidad de Medicina Genómica, Facultad de Medicina, UNAM and Hospital General de México, México, D.F. 06726, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 24 June 2013

Available online 3 July 2013

#### Keywords:

Beta cells

Cx30.2

Cx36

Gap junctions

Glucose

### ABSTRACT

Nowadays, connexin (Cx) 36 is considered the sole gap junction protein expressed in pancreatic beta cells. In the present research we investigated the expression of Cx30.2 mRNA and protein in mouse pancreatic islets. Cx30.2 mRNA and protein were identified in isolated islet preparations by qRT-PCR and Western blot, respectively. Immunohistochemical analysis showed that insulin-positive cells were stained for Cx30.2. Confocal images from double-labeled pancreatic sections revealed that Cx30.2 and Cx36 fluorescence co-localize at junctional membranes in islets from most pancreases. Abundant Cx30.2 tiny reactive spots were also found in cell cytoplasm. In beta cells cultured with stimulatory glucose concentrations, Cx30.2 was localized in both cytoplasm and cell membranes. In addition, Cx30.2 reactivity was localized at junctional membranes of endothelial or cluster of differentiation 31 (CD31) positive cells. Moreover, a significant reduction of Cx30.2 mRNA was found in islets preparations incubated for 24 h in 22 mM as compared with 3.3 mM glucose. Therefore, it is concluded that Cx30.2 is expressed in beta and vascular endothelial cells of mouse pancreatic islets.

© 2013 The Authors. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Gap junctions (GJ) are conglomerates of intercellular channels. In vertebrates they are mainly formed by a family of homologous transmembrane proteins (~20) termed connexins (Cxs). These channels allow the direct intercellular transfer of molecules and second messengers between adjacent cells. A connexon or hemichannel is a hexamer. Docking of two connexons forms an intercellular channel. Since cells, from most tissues, express more than one Cx subtype, intercellular channels may be homotypic (both connexons formed by the same Cx subtype), heterotypic (each connexon formed by a different Cx subtype) or heteromeric (each connexon formed by more than one Cx). Moreover, hemichannels at the cell membrane may be active [1]. Alterations in Cxs are

involved in human pathology and their deficiency is critical for cell development [2,3].

Diabetes is a chronic disease that involves different metabolic disorders where subjects have in common high blood glucose levels. Its world prevalence has increased around ten times in the last 4 decades [4]. Among the different hormones that regulate glucose homeostasis, insulin is the only one that decreases glucose levels. Insulin is produced in beta cells that, in mouse, constitute most of the islet central mass (~80%). The glucose insulin release response curve from isolated perfused islets is well fitted by a sigmoidal function, with a threshold at ~6 mM followed by a linear increase that reaches its saturating point at ~22 mM [5]. Insulin secretion depends critically on electrical activity of beta cells induced by glucose. This electrical activity consists of bursts of action potentials which happen synchronously and in phase in most beta cells from a single islet. This high electrical synchrony produces cyclic changes in the interstitial [K<sup>+</sup>] and [Ca<sup>2+</sup>] [6] and in the intracellular Ca<sup>2+</sup> ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) concentrations [7,8] in the different islet regions. The latter determines pulses of insulin release [8–10].

Electrical coupling [11] through GJ [12] intercommunicates most pancreatic beta cells [13,14]. Cx36 is localized at junctional membranes of beta cells in rodent [14–17] and human islets [18]. Isolated islets cells from Cx36-deficient mice lack synchronization in their [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> oscillations and exhibit loss of pulses of

<sup>☆</sup> This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

\* Corresponding author. Address: Laboratorio de sinapsis eléctricas, Unidad de Medicina Experimental y Departamento de Biología Celular y Tisular, Torre de Investigación, 5to piso, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 3000, Copilco Universidad, Mexico, D.F. 04510, Mexico.

E-mail addresses: [emperezarmendariz@aol.com](mailto:emperezarmendariz@aol.com), [mperezarmendariz@aol.com](mailto:mperezarmendariz@aol.com) (E.M. Pérez-Armendariz).

insulin release induced by glucose [8]. Moreover, Cx36-deficient mice are glucose intolerant [19]. These alterations have been explained to result from beta cells uncoupling since neither GJ particles [8] nor electrical or chemical coupling [20,21] were detected in islet cells from these animals.

From above, Cx36 is considered the only Cx expressed in beta cells. However, besides Cx36, the mRNA of Cx43 and Cx45 have been identified in rodent beta cells purified by cell sorting [22] and of Cx30.3, Cx31, Cx31.1, Cx31.9, Cx37, Cx43 and Cx45 in human islets by RT-PCR [18]. However the cell-specific distribution of most of these Cxs remains to be determined.

Moreover, we have previously proposed that GJ channels in mouse beta cells are heteromeric [14]. This was based on the characterization of the biophysical properties of the junctional currents recorded in dual voltage clamped freshly isolated beta cell pairs [13,14]. Intercellular channels in beta cells are weekly voltage sensitive and have a tiny main unitary conductance ( $\gamma_j$ , ~6 pS) [14]. In the present research, we looked for the expression of Cx30.2 because it is the other member from the Cx family, besides Cx36, whose biophysical properties are most compatible with those recorded in isolated beta cell pairs.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

CD1. mice were maintained and handled in accordance with the national and international Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals, as promulgated by the Society for the Study of Reproduction. Animals were anaesthetized and sacrificed by decapitation before tissue dissection.

### 2.2. Western blot

About 500 islets were isolated from 12 pancreases and homogenized by sonication. Proteins were extracted using buffer (RIPA #20–188, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) with protease inhibitors (P8340, Sigma, St. Louis, MO, USA). Gels were loaded with 50  $\mu$ g of total protein. The electrophoretic run and transfer protein protocols were performed as previously described [23]. The membranes were incubated overnight at 4 °C with rabbit anti-Cx30.2 (Invitrogen, CA, USA; 1:100). After rinsed, they were incubated for 1 h at room temperature with a horseradish peroxidase (HRP) goat secondary antibody (1:5000). Blots were revealed with chemiluminescence (SuperSignal West Pico, Pierce, Milwaukee, WI, USA).

### 2.3. Immunohistochemistry

(IHC). Pancreases (10 mice) were fixed in 4% buffered paraformaldehyde for 24 h. After antigens were retrieval with citrate buffer and endogenous peroxidase was blocked, serial sections were incubated with anti-Cx30.2 (1:50), anti-Cx36 (Invitrogen, CA, USA; 1:50) or guinea pig anti-insulin (Invitrogen, CA, USA; 1:2000) for 18 h at 4 °C. After rinsed, sections were incubated for 30 min at 37 °C with an HRP secondary antibody (1:500), and immunoreactivity was revealed by incubation in 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Zymed, CA, USA). As negative controls, sections were incubated only with a secondary antibody.

### 2.4. Immunofluorescence

Pancreatic cryosections were co-incubated overnight at 4 °C with anti-Cx30.2 (1:100) and monoclonal anti-Cx36 (1:100), or anti-cluster of differentiation 31 (CD31, BD Pharmingen, San Diego,

USA; 1:500). Isolated cultured beta cells were also co-incubated with anti-Cx30.2 and anti-insulin (1:100). After rinsed, sections and cells were revealed with their corresponding secondary antibodies. Images were acquired using a confocal laser-scanning microscope (Olympus model FV1000, Japan). For each experimental condition, at least seven different pancreases were analyzed. As negative controls, sections were incubated only with the corresponding secondary antibody.

### 2.5. Islets and beta cells cultures

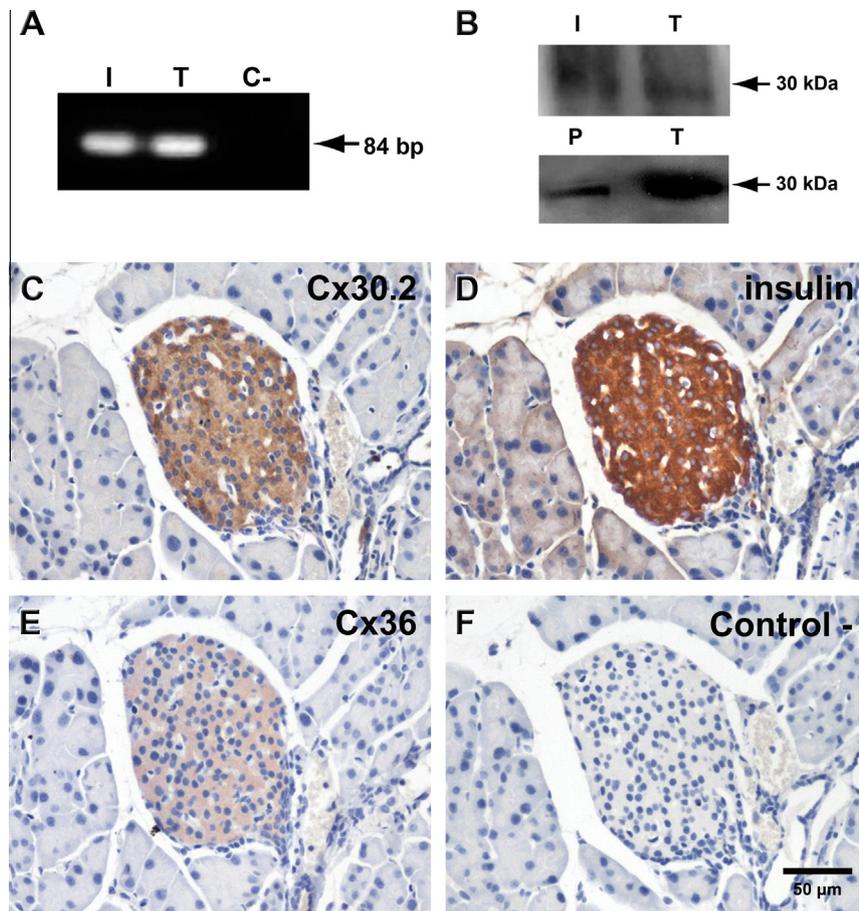
Islets of Langerhans were dissociated from minced pancreases using collagenase 3 mg/ml in Krebs ringer solution with 3% albumin, as previously described [13]. Collected islets were incubated overnight in a DMEM medium (GIBCO, Grand Island, NY, USA) with 11 mM D-glucose. The next day, islets were incubated for 24 h in the DMEM containing 3.3 or 22 mM glucose. Beta cells were dispersed from batches of 150 islets following a protocol previously described [13] and cultured in RPMI with 11 or 22 mM glucose overnight before processed for immunofluorescence studies. Islets and cells were cultured at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. All culture media were supplemented with 100 U/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin and 10% of fetal bovine serum (FBS).

### 2.6. RNA Isolation

Total RNA was isolated from five pools of isolated islets (~450), collected from 12 pancreases for each culture condition (3.3 or 22 mM glucose), using the RNeasy Mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), according to the manufacturer's protocol. The quality and purity of RNA was confirmed as previously described [23]. Traces of DNA were removed by digestion with RNase-free DNase I (Invitrogen, CA, USA) following the manufacturer's protocol.

### 2.7. Real-time quantitative retrotranscription

PCR (qRT-PCR). Reverse transcription of total RNA was performed as previously reported [23]. The expression of Cx30.2 and Cx36 genes was explored in islets incubated in 3.3 or 22 mM glucose with qRT-PCR using TaqMan probes. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as an internal control. TaqMan gene expression assays were used (Cx30.2, Mm00731344\_s1, Cx36 Mm00439121\_m1 and GAPDH, Mm99999915\_g1; Applied Biosystems). The cDNA from five different pools were explored in duplicates in a final volume of 20  $\mu$ l, including 100 ng of cDNA template, 10  $\mu$ l of 2X TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1  $\mu$ l of 20X TaqMan Gene Expression Assay, and 7  $\mu$ l of RNase-free water. The cycling program was run in a 7500 real time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, USA), which was set as follows: an initial PCR activation step at 50 °C for 2 min followed by 95 °C for 10 min, then 45 cycles of melting at 95 °C for 30s and annealing/extension at 62 °C for 1 min. Measurement of gene expression was based on relative standard curves constructed from a 10-fold serially diluted pool of islets cDNAs ranging from 500 to 0.05 ng. Curves for GAPDH gene were tested in three different experiments ran in duplicate. The correlation coefficient ( $r$ ) average was higher than 0.98. The expression of target genes was calculated based on the GAPDH standard curve and normalized in each experiment to the intensity of the internal reference (GADPH) using a previously described method [29]. The normalized intensity values were measured in ng/ $\mu$ l. The statistical significance of the differences between the groups was calculated with the  $t$ -test.



**Fig. 1.** Cx30.2 mRNA and protein are expressed in pancreatic islets. RT-PCR analysis of cDNA obtained from three batches of isolated islets. (A) A 84 bp band, as expected for Cx30.2, was detected in an electrophoresis gel loaded with reactions from islets (I) and testis (T), but not in reactions in which cDNA was substituted by H<sub>2</sub>O. (B) Western blot, where a band of 30 kDa is detected in total homogenate from total pancreas (P), islets (I) and testis (T). (C–F). Digital images of 3 µm thick pancreatic serial sections revealed with immunoperoxidase, show that insulin positive cells (D) express Cx30.2 (C) and Cx36 (E). No reactivity was found with the secondary antibody (F).

### 3. Results

To address whether the Cx30.2 gene is expressed in pancreatic islets, the mRNA expression was explored by RT-PCR and the protein by Western blot. Fig. 1A shows an electrophoretic gel where a PCR product of the expected size (84 bp) for Cx30.2 mRNA is detected in lanes loaded with reactions from mouse islets and testis but not in reactions where H<sub>2</sub>O substituted cDNA. These last ones were used as positive and negative controls, respectively. Cx30.2 mRNA was also identified in rat, hamster and guinea pig pancreases (not shown). Fig. 1B shows an image of a Western blot where a band of 30 kDa is identified in lanes loaded with homogenates from total pancreas (lower panel), isolated islets (upper panel) and testis. The latter demonstrates that the anti-Cx30.2 antibody used recognized this Cx.

To identify the cell specific distribution of Cx30.2, IHC experiments were performed in 3 µm thick serial sections of pancreases. Figure 1 shows that cells positively stained with anti-Cx30.2 (C) were also labeled with anti-insulin (D) and anti-Cx36 (E) which is another beta cell marker. In contrast exocrine acinar cells were not labeled. In addition islets from sections incubated only with secondary antibody were not stained (F). Thus, these findings demonstrate that Cx30.2 protein is localized in beta cells.

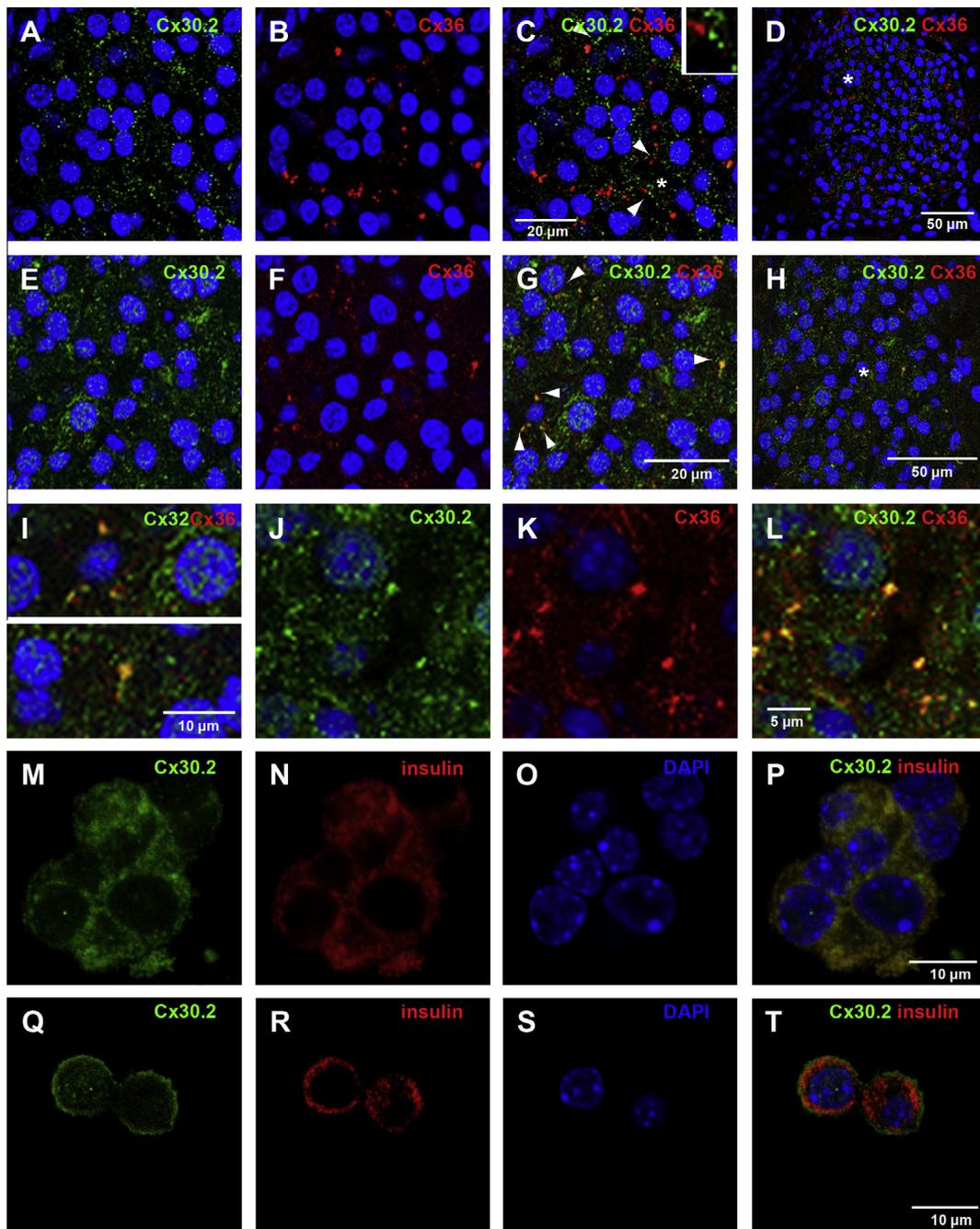
The subcellular distribution of Cx30.2 in beta cells was investigated by immunofluorescent (IF) studies. Fig. 2A–L shows confocal images from 1 µm thick pancreatic sections from three mice,

double-labeled with anti-Cx30.2 and anti-Cx36. Tiny reactive spots of Cx30.2 were found in beta cells cytoplasm (Fig. 2A, E, J). In addition, in some islets, Cx30.2 reactive spots were also found at cell membrane appositions (Fig. 2A), as indicated by their spatial distribution close to Cx36-IF labeling (Fig. 2B). This spatial relation is better illustrated in merge image (Fig. 2C and insert) where Cx30.2 (green) is found adjacent to Cx36 (red). This region is also shown at a lower amplification (Fig. 2D, asterisk).

In other islets (5 of 7), Cx30.2 -reactive spots at cells membranes (Fig. 2E) were found to have a noteworthy similar spatial distribution to Cx36 protein (Fig. 2F). This is better illustrated in the merge image (Fig. 2G) where Cx30.2 (green) is shown to co-localize with Cx36 (red) at junctional membranes (yellow, arrowheads). This pattern is also shown at a lower (Fig. 2H) and higher amplification (Fig. 2I). Co-localization of Cx30.2 and Cx36 at junctional membranes is also shown in beta cells from another islet (Fig. 2J–L).

Distribution of Cx30.2 was also analyzed in beta cell cultures. Fig. 2M–T shows confocal images of insulin positive cells (red) from two different cell cultures incubated with 22 mM glucose. Cx30.2 reactivity (green) was localized in the whole beta cell volume, as shown in different optical sections (Fig. 2M–P). Furthermore, in some beta cells Cx30.2-IF reactivity was higher at the cell membrane than in the cytoplasm (Fig. 2Q–T).

High glucose concentrations increase blood flow in the islet where endothelial and beta cells are intimately associated [24].

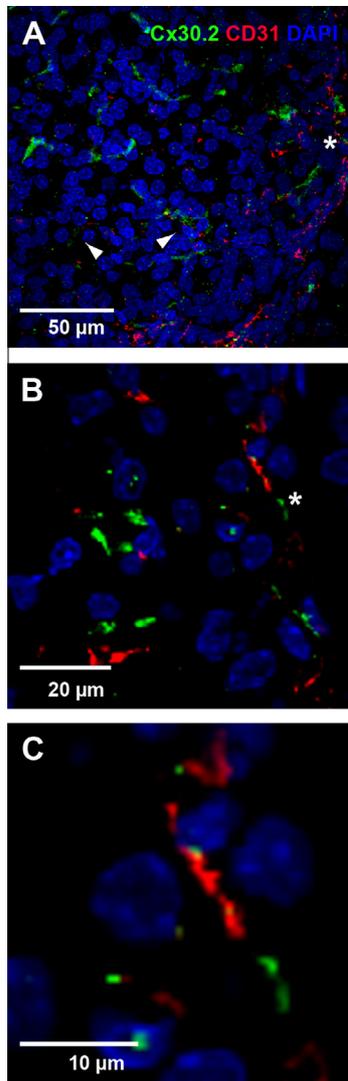


**Fig. 2.** Cx30.2 is expressed in beta cell cytoplasm, junctional and non junctional membranes. (A–L) Confocal images of pancreatic sections, 1 μm thick, double-labeled, with anti-Cx30.2 (green) and anti-Cx36 (red), where nuclei are stained with DAPI (blue). Abundant tiny Cx30.2-IF spots are found at pancreatic beta cell cytoplasm and nonjunctional membranes from three islets (A, E, J). Moreover, in some islets, Cx30.2 (A, green) and Cx36 (B, red) reactive spots alternate at junctional membrane areas (C arrowheads, insert, and D, asterisk). In other islets, Cx30.2 reactivity (E) is distributed at the same junctional membranes as Cx36 (F). In these areas, as shown at different amplifications, both Cxs co-localize (G, H and I, yellow). Co-localization of both Cxs is also shown for a third islet (J–L). (M–T) Images, of 1 μm thick confocal sections, of a beta cell clump cultured at 22 mM glucose, double-labeled with anti-Cx30.2 (green) and anti-insulin antibodies (red). Cx30.2 is localized in beta cell cytoplasm (M–P). In some beta cells a higher density of Cx30.2 is found at the cell membranes (Q–T).

Therefore, we investigated whether Cx30.2 is expressed in blood vessels of pancreatic islets. For this, pancreatic sections were co-incubated with anti-Cx30.2 and anti-CD31, which is a marker of the endothelial cells membranes [25]. Confocal images shown in Fig. 3A illustrate that cells positive for CD31 (red) and Cx30.2 (green) are localized in blood vessels distributed both at the periphery (asterisk) and at the center (arrowheads) of pancreatic

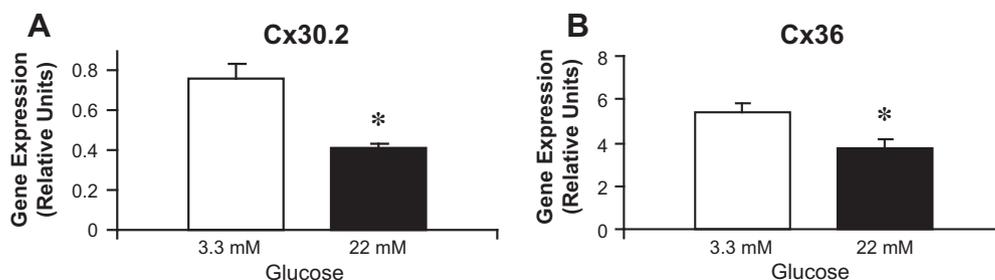
islets. At a high magnification, Cx30.2 is shown to localize in endothelial cells closely associated with CD31 at junctional membranes (Fig. 3B and C).

Cx36 mRNA has been found to decrease in rat islets maintained under glucose stimulation for 24 h [26]. To explore whether Cx30.2 gene is also modulated by glucose its mRNA was quantified by qRT-PCR after islets were incubated for 24 h in low (3 mM) and



**Fig. 3.** Cx30.2 is expressed at junctional membranes in islet vascular endothelial cells. Confocal images of pancreatic sections of 1  $\mu\text{m}$  thickness, co-incubated with anti-Cx30.2 (green) and anti-CD31 (red), an endothelial cell marker. Cx30.2 is expressed in central (arrowheads) and peripheral (asterisk) blood vessels (A), localized at junctional membranes (asterisk) of endothelial cells (B–C).

high (22 mM) glucose. A significant decrease in Cx30.2 of a 45% (Fig. 4A) and in Cx36 of a 31% (Fig. 4B) mRNAs was found in islets maintained under high glucose concentration ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 4.** High glucose concentration downregulates Cx30.2 mRNA levels in isolated islets. Quantitative qRT-PCR analysis of Cx30.2 mRNA in islets after a 24 h incubation at low (3.3 mM) and high (22 mM) glucose concentrations. Transcript levels were normalized with respect to the constitutive gene GAPDH. A 45% decrease in the Cx30.2 (A) mRNA was found under high glucose concentration whereas Cx36 mRNA, was reduced in 31% (B). Data are means  $\pm$  S.E.M. ( $P < 0.05$ ),  $n = 5$  pools for each experimental condition.

#### 4. Discussion

This research demonstrates that Cx30.2 is expressed in pancreatic islet beta cells. This conclusion is based on the detection of Cx30.2 mRNA by qRT-PCR in rodent islet cells preparations. It is also supported by the detection of 30 kDa-band protein in islets homogenates. In addition, Cx30.2 protein was shown clearly localized in insulin positive cells by IHC. Moreover, IF experiments revealed that Cx30.2 co-localizes with Cx36 protein, which is well known to be expressed at beta cells junctional membranes. Furthermore, IF analysis in cell cultures confirmed that insulin positive cells express Cx30.2.

Here, it is demonstrated by IHC studies that both Cx30.2 and Cx36 are localized to beta cells. Moreover, by confocal images and IF studies we documented that Cx30.2 and Cx36 co-localize at junctional membranes of beta cells from most islets. This result indicates that in beta cells both connexins co-exist at the same junctional plaques.

Co-localization of Cx30.2 and Cx36 at junctional plaques is consistent with the hypothesis that GJ channels in beta cells are heteromeric [14]. Although similar, the biophysical properties of junctional conductance ( $g_j$ ) recorded in dual voltage clamped beta cell pairs were not identical to those of Cx36 channels as recorded in cell expression systems. Specifically, beta cell  $g_j$  was not affected with a concentration of quinine 1 mM, that is 28 times higher [14] than the concentration found ( $EC_{50}$  5  $\mu\text{M}$ ) to close the Cx36 GJ channels in cell expression systems [27]. Furthermore, the relationship between the normalized steady-state junctional conductance ( $G_{ss}$ ) and the transjunctional voltage applied between dual voltage clamped isolated beta cell pairs was heterogeneous. In 55% of the cell pairs  $G_{ss}$  was voltage insensitive, while in the remaining 45% a symmetrical weak voltage sensitivity was found. In the latter group of beta cell pairs, the half transjunctional voltage dependence ( $V_o = \pm 85$ ) was 10 mV higher [14] than in Cx36 channels ( $V_o = \pm 75$ ) [28,29]. Further studies are required to prove this hypothesis. So far, both Cx30.2 [30] and Cx36 [28,29] intercellular channels are known to be weakly voltage sensitive, poorly anion selective and have a tiny unitary conductance ( $\gamma_j \sim 10$  pS). Then, differences in biophysical properties of beta cell intercellular channels with respect to those of Cx36 [13,14] may well be explained by the co-expression of Cx36 and Cx30.2.

Confocal images showed that in some pancreatic islets Cx30.2 IF-spots were also found adjacent to Cx36 ones. This result suggests that homomeric plaques formed only with Cx30.2 also exist in islet beta cells. It also suggests that groups of Cx30.2 inter-communicated beta cells may be involved in the Cx36-independent component of circulating blood insulin oscillations found in Cx36 deficient mice [19]. Nonetheless, since in these mice no GJ particles [8] or coupling [8,20,21] have been detected in islet beta cells that exhibited an uncoordinated  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  activity [8,21], it is possible that

Cx30.2 distribution at the junctional plaques may depend in part on Cx36 expression.

Cx30.2 was also localized in the whole volume of beta cells, as shown here by images from islet and cultured cells. This raises the possibility that Cx30.2 is also expressed at non junctional cell membranes. This is supported by the higher Cx30.2-IF reactivity found in cell membranes compared with the one found in cytoplasm in some cultured beta cells (Fig. 2Q–T). It is also supported by the abundant tiny Cx30.2-IF spots at the non junctional membrane areas. Some Cxs form hemichannels, including Cx30.2 [30]. Hemichannels may be active under in vivo conditions as previously reviewed [1]. Therefore, it is possible that Cx30.2 forms hemichannels in native pancreatic beta cells. Further studies are required to prove this hypothesis.

Here we also provide for the first time evidence that Cx30.2 is localized at GJ of endothelial cells of islet blood vessels. Cx30.2 has been described at junctional membranes of blood vessels of testis [31] and retina [32]. Incubation under high glucose concentration (30 mM) downregulates Cx30.2 protein in rat retinal endothelial cells [32]. Therefore, the relative decrease of Cx30.2 mRNA in islet preparations identified here by qRT-PCR may result from its reduction in beta and/or in vascular endothelial islet cells. Further studies are required to discern between these possibilities.

Overall, results obtained in this research demonstrate for the first time that Cx30.2 is expressed at junctional membranes of endothelial and beta cells of mouse pancreatic islets. Beyond these findings, our results demonstrate that there is an abundant expression of Cx30.2 in beta cells besides Cx36. This finding constitutes a tipping point for the understanding of how do GJ proteins regulate beta cell function.

## Acknowledgments

This research was funded by the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) with Grant No. DGAPA IN231011 and by the CONACyT Grant No. 51243Q, to E.M. Pérez Armendariz. Cristina Coronel-Cruz received a Doctoral Fellowship from CONACyT, CVU 42623 for the Doctorado en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, UNAM. The author thanks Dr. Ignacio González-Sánchez and Dr. Dany Page for a critical reading of this article. We also thank the technical assistance of our colleagues Raquel Guerrero Alquicira, Lic Javier Diaz, Dr. Enrique Pinzón Estrada, Dr. Ismael Torres Saldaña and Dr. Victor Manuel Salgado from the Facultad de Medicina, UNAM and Dr. Karina Jiménez Durán from the USAI, Facultad de Química, UNAM.

## References

- J.C. Saez, K.A. Schalper, M.A. Retamal, J.A. Orellana, K.F. Shoji, M.V. Bennett, Cell membrane permeabilization via connexin hemichannels in living and dying cells, *Exp. Cell. Res.* 316 (2010) 2377–2389.
- T.W. White, D.L. Paul, Genetic diseases and gene knockouts reveal diverse connexin functions, *Annu. Rev. Physiol.* 61 (1999) 283–310.
- R. Dobrowolski, K. Willecke, Connexin-caused genetic diseases and corresponding mouse models, *Antioxid. Redox. Signal.* 11 (2009) 283–295.
- H. King, R.E. Aubert, W.H. Herman, Global burden of diabetes, 1995–2025: prevalence, numerical estimates, and projections, *Diabetes. Care.* 21 (1998) 1414–1431.
- I. Atwater, M. Kukuljan, E. Pérez-Armendariz, Molecular biology of the ion channels in the pancreatic B-cell, in: B. Draznin, D. LeRoith (Eds.), *Mol. Bio. Diabetes. Part I*, Humana Press Inc., Tototwa, NJ., 1994, pp. 303–332.
- E. Perez-Armendariz, I. Atwater, Glucose-evoked changes in [K<sup>+</sup>] and [Ca<sup>2+</sup>] in the intercellular spaces of the mouse islet of Langerhans, *Adv. Exp. Med. Biol.* 211 (1986) 31–51.
- R.M. Santos, L.M. Rosario, A. Nadal, J. Garcia-Sancho, B. Soria, M. Valdeolillos, Widespread synchronous [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> oscillations due to bursting electrical activity in single pancreatic islets, *Pflugers. Arch.* 418 (1991) 417–422.
- M.A. Ravier, M. Guldenagel, A. Charollais, A. Gjinovci, D. Caille, G. Sohl, C.B. Wollheim, K. Willecke, J.C. Henquin, P. Meda, Loss of connexin36 channels alters beta-cell coupling, islet synchronization of glucose-induced Ca<sup>2+</sup> and insulin oscillations, and basal insulin release, *Diabetes.* 54 (2005) 1798–1807.
- L.M. Rosario, I. Atwater, A.M. Scott, Pulsatile insulin release and electrical activity from single ob/ob mouse islets of Langerhans, *Adv. Exp. Med. Biol.* 211 (1986) 413–425.
- I. Atwater, M. Kukuljan, E.M. Pérez-Armendariz, (Eds.), *Molecular biology of the ion channels in the pancreatic B-cell*, 1994.
- G.T. Eddlestone, A. Goncalves, J.A. Bangham, E. Rojas, Electrical coupling between cells in islets of Langerhans from mouse, *J. Membr. Biol.* 77 (1984) 1–14.
- L. Orci, R.H. Unger, A.E. Renold, Structural coupling between pancreatic islet cells, *Experientia.* 29 (1973) 1015–1018.
- M. Perez-Armendariz, C. Roy, D.C. Spray, M.V. Bennett, Biophysical properties of gap junctions between freshly dispersed pairs of mouse pancreatic beta cells, *Biophys. J.* 59 (1991) 76–92.
- A.P. Moreno, V.M. Berthoud, G. Perez-Palacios, E.M. Perez-Armendariz, Biophysical evidence that connexin-36 forms functional gap junction channels between pancreatic mouse beta-cells, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 288 (2005) E948–956.
- V. Serre-Beinier, S. Le Guron, N. Belluardo, A. Trovato-Salinaro, A. Charollais, J.A. Haefliger, D.F. Condorelli, P. Meda, Cx36 preferentially connects beta-cells within pancreatic islets, *Diabetes.* 49 (2000) 727–734.
- S. Le Guron, D. Martin, A. Formenton, P. Maechler, D. Caille, G. Waeber, P. Meda, J.A. Haefliger, Connexin-36 contributes to control function of insulin-producing cells, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 37690–37697.
- A.R. Leite, C.P. Carvalho, A.G. Furtado, H.C. Barbosa, A.C. Boschero, C.B. Collares-Buzato, Co-expression and regulation of connexins 36 and 43 in cultured neonatal rat pancreatic islets, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 83 (2005) 142–151.
- V. Serre-Beinier, D. Bosco, L. Zulianello, A. Charollais, D. Caille, E. Charpentier, B.R. Gauthier, G.R. Diaferia, B.N. Giepmans, R. Lupi, P. Marchetti, S. Deng, L. Buhler, T. Berney, V. Cirulli, P. Meda, Cx36 makes channels coupling human pancreatic beta-cells, and correlates with insulin expression, *Hum. Mol. Genet.* 18 (2009) 428–439.
- W.S. Head, M.L. Orseth, C.S. Nunemaker, L.S. Satin, D.W. Piston, R.K. Benninger, Connexin-36 gap junctions regulate in vivo first- and second-phase insulin secretion dynamics and glucose tolerance in the conscious mouse, *Diabetes.* 61 (2012) 1700–1707.
- S. Speier, A. Gjinovci, A. Charollais, P. Meda, M. Rupnik, Cx36-mediated coupling reduces beta-cell heterogeneity, confines the stimulating glucose concentration range, and affects insulin release kinetics, *Diabetes.* 56 (2007) 1078–1086.
- R.K. Benninger, M. Zhang, W.S. Head, L.S. Satin, D.W. Piston, Gap junction coupling and calcium waves in the pancreatic islet, *Biophys. J.* 95 (2008) 5048–5061.
- A. Charollais, V. Serre, C. Mock, F. Cogne, D. Bosco, P. Meda, Loss of alpha one connexin does not alter the prenatal differentiation of pancreatic beta cells and leads to the identification of another islet cell connexin, *Dev. Genet.* 24 (1999) 13–26.
- E.M. Perez-Armendariz, L. Cruz-Miguel, C. Coronel-Cruz, M. Esparza-Aguilar, E. Pinzon-Estrada, E. Rancano-Camacho, G. Zacarias-Climaco, P.F. Olivares, A.M. Espinosa, I. Becker, J.C. Saez, J. Berumen, G. Perez-Palacios, Connexin 36 is expressed in beta and connexins 26 and 32 in acinar cells at the end of the secondary transition of mouse pancreatic development and increase during fetal and perinatal life, *Anat. Rec. (Hoboken).* 295 (2012) 980–990.
- O.C. Richards, S.M. Raines, A.D. Attie, The role of blood vessels, endothelial cells, and vascular pericytes in insulin secretion and peripheral insulin action, *Endocr. Rev.* 31 (2010) 343–363.
- T.H. Lindsay, K.G. Halvorson, C.M. Peters, J.R. Ghilardi, M.A. Kuskowski, G.Y. Wong, P.W. Mantyh, A quantitative analysis of the sensory and sympathetic innervation of the mouse pancreas, *Neuroscience.* 137 (2006) 1417–1426.
- F. Allagnat, D. Martin, D.F. Condorelli, G. Waeber, J.A. Haefliger, Glucose represses connexin36 in insulin-secreting cells, *J. Cell. Sci.* 118 (2005) 5335–5344.
- M. Srinivas, M.G. Hopperstad, D.C. Spray, Quinine blocks specific gap junction channel subtypes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 98 (2001) 10942–10947.
- M. Srinivas, R. Rozental, T. Kojima, R. Dermietzel, M. Mehler, D.F. Condorelli, J.A. Kessler, D.C. Spray, Functional properties of channels formed by the neuronal gap junction protein connexin36, *J. Neurosci.* 19 (1999) 9848–9855.
- B. Teubner, J. Degen, G. Sohl, M. Guldenagel, F.F. Bukauskas, E.B. Trexler, V.K. Verselis, C.I. De Zeeuw, C.G. Lee, C.A. Kozak, E. Petrasch-Parwez, R. Dermietzel, K. Willecke, Functional expression of the murine connexin 36 gene coding for a neuron-specific gap junctional protein, *J. Membr. Biol.* 176 (2000) 249–262.
- F.F. Bukauskas, M.M. Kreuzberg, M. Rackauskas, A. Bukauskiene, M.V. Bennett, V.K. Verselis, K. Willecke, Properties of mouse connexin 30.2 and human connexin 31.9 hemichannels: implications for atrioventricular conduction in the heart, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 103 (2006) 9726–9731.
- P.A. Nielsen, N.M. Kumar, Differences in expression patterns between mouse connexin-30.2 (Cx30.2) and its putative human orthologue, connexin-31.9, *FEBS. Lett.* 540 (2003) 151–156.
- J. Manasson, T. Tien, C. Moore, N.M. Kumar, S. Roy, High glucose-induced downregulation of connexin 30.2 promotes retinal vascular lesions: implications for diabetic retinopathy, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54 (2013) 2361–2366.