



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Caracterización electrofisiológica de los canales de potasio dependientes de voltaje Kv2 en células beta pancreáticas de rata con síndrome metabólico”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
Omar Iván Facio Martínez

TUTOR PRINCIPAL  
Dra. Myrian Velasco Torres  
[Instituto de Fisiología Celular](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Sara Luz Morales Lázaro  
[Instituto de Fisiología Celular](#)

Dra. Tatiana Fiordelisio Coll  
[Facultad de Ciencias](#)

Ciudad de México, 2024



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y  
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL**

**(Graduación con trabajo escrito)**

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado: "Caracterización electrofisiológica de los canales de potasio dependientes de voltaje Kv2 en células beta pancreáticas de rata con síndrome metabólico" que presenté para obtener el grado de---Maestría--- es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

**Atentamente**

Una firma manuscrita en tinta negra que parece ser 'Omar Iván Facio Martínez'.

**Omar Iván Facio Martínez, 312085575**



CGEP/PMDCBQ/1543  
BC5A14-65A1CDD76BEE6  
Asunto: Jurado de examen

**FACIO MARTINEZ OMAR IVÁN**  
Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas  
Presente

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del **11 de diciembre de 2023**, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Maestro en Ciencias**, con la réplica de la tesis "**Caracterización electrofisiológica de los canales de potasio dependientes de voltaje Kv2 en células beta pancreáticas de rata con síndrome metabólico**", dirigida por el/la Dr(a). **VELASCO TORRES MYRIAN**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

ROSENBAUM EMIR TAMARA LUTI	PMDCBQ	PRESIDENTE
TREVIÑO SANTA CRUZ CLAUDIA LYDIA	PMDCBQ	SECRETARIO
GARCÍA DÍAZ DAVID ERASMO	PMDCBQ	VOCAL
LARQUÉ VELÁZQUEZ CARLOS ALFONSO	PMDCBQ	VOCAL
LUIS BALTAZAR ENOCH	PMDCBQ	VOCAL

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 8 de enero de 2024

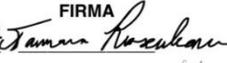
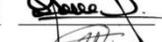
**Coordinadora**  
**Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz**

**SINODALES DESIGNADOS**  
**Presente**

Estimado académico:

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del **11 de diciembre de 2023**, conocieron la solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Maestro en Ciencias** del/la estudiante **FACIO MARTINEZ OMAR IVÁN**, con la tesis "**Caracterización electrofisiológica de los canales de potasio dependientes de voltaje Kv2 en células beta pancreáticas de rata con síndrome metabólico**", dirigida por el/la Dr(a). **VELASCO TORRES MYRIAN**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado en el que se encuentra usted incluido:

			ACEPTA	FECHA	FIRMA
ROSENBAUM EMIR TAMARA LUTI	PMDCBQ	PRESIDENTE	SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	30 / 01 / 24	
TREVIÑO SANTA CRUZ CLAUDIA LYDIA	PMDCBQ	SECRETARIO	SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	31 / 01 / 24	
GARCÍA DÍAZ DAVID ERASMO	PMDCBQ	VOCAL	SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	06 / 02 / 24	
LARQUÉ VELÁZQUEZ CARLOS ALFONSO	PMDCBQ	VOCAL	SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	06 / 02 / 24	
LUIS BALTAZAR ENOCH	PMDCBQ	VOCAL	SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	07 / 02 / 24	

Una vez firmado este documento, favor de enviarlo a la Coordinación al correo [ipalacios@posgrado.unam.mx](mailto:ipalacios@posgrado.unam.mx)

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
**Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 8 de enero de 2024**



**Coordinadora**  
**Dra. Claudia Lydía Treviño Santa Cruz**

## Agradecimientos Académicos

El presente trabajo se realizó en el laboratorio AL-201 de la División de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), en el programa Ciencia de Frontera modalidad grupal, proyecto: “Análisis del efecto aditivo de azúcar y arsénico en el desarrollo del síndrome metabólico y la diabetes mellitus tipo 2” (#568492).

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por haberme otorgado una beca durante la realización del presente estudio de maestría (número de CVU: 1084066).

Agradezco a la Dra. Tatiana Fiordeliso Coll y a la Dra. Sara Luz Morales Lázaro por su asesoría durante la realización del presente proyecto.

Agradezco a la Dra. Marcia Hiriart Urdanivia por permitirme formar parte de su laboratorio.

Le doy un agradecimiento especial a la Dra. Myrian Velasco Torres por haber sido paciente y perseverante en mi enseñanza, sin su apoyo y su dedicación este trabajo no hubiese sido posible.

**Dr. Ricardo Mejía Zepeda**

30-04-2024 q.e.p.d

*In memoriam*

## Contenido

<b>Índice de figuras</b> .....	I
<b>Índice de tablas</b> .....	II
<b>Índice de abreviaturas</b> .....	III
<b>Resumen</b> .....	IV
<b>Abstract</b> .....	V
<b>Introducción</b> .....	1
1. Síndrome metabólico .....	1
1.1. Modelos animales de síndrome metabólico .....	3
2. Páncreas e islotes pancreáticos .....	4
2.1. Células $\beta$ pancreáticas e insulina .....	6
3. Secreción de insulina estimulada por glucosa.....	8
3.1. Eventos metabólicos .....	8
3.2. Eventos eléctricos .....	9
3.3. Exocitosis de insulina.....	10
4. Canales de potasio activados por voltaje Kv2 .....	12
4.1. Estructura de los canales Kv2 .....	13
4.2. Propiedades biofísicas y farmacológicas.....	16
4.3. Regulación endógena de los canales de potasio Kv2.1 .....	19
5. Antecedentes .....	20
<b>Planteamiento del problema</b> .....	21
<b>Hipótesis</b> .....	21
<b>Objetivos</b> .....	22
General.....	22
Particulares.....	22
<b>Metodología</b> .....	23
Modelo de SM en rata .....	23
Caracterización del modelo .....	23
1. Pruebas de tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina .....	24
2. Parámetros somatométricos.....	24
3. Cuantificación de niveles plasmáticos de insulina y triglicéridos .....	24
Cultivo primario de células insulares.....	25
Caracterización electrofisiológica .....	26

Inmunofluorescencia.....	29
Análisis estadístico.....	30
<b>Resultados</b> .....	<b>32</b>
Consumo calórico.....	32
Caracterización del modelo .....	33
Caracterización electrofisiológica .....	38
Expresión de canales Kv2.....	44
<b>Discusión</b> .....	<b>47</b>
Desarrollo del síndrome metabólico .....	47
Los canales Kv2 en el síndrome metabólico.....	50
<b>Conclusión</b> .....	<b>53</b>
<b>Referencias bibliográficas</b> .....	<b>54</b>

## Índice de figuras

FIGURA 1. LOCALIZACIÓN ANATÓMICA DEL PÁNCREAS.....	4
FIGURA 2. COMPONENTES ENDOCRINOS Y EXOCRINOS DEL PÁNCREAS...	5
FIGURA 3. COMPARACIÓN DEL PORCENTAJE Y DISTRIBUCIÓN DE LOS DIFERENTES TIPOS DE CÉLULAS EN ISLOTES DE ROEDOR Y HUMANO. .....	7
FIGURA 4. MECANISMO DE SECRECIÓN DE INSULINA ESTIMULADA POR GLUCOSA (GSIS).....	10
FIGURA 5. PROCESO POR EL QUE PASAN LOS GRÁNULOS SECRETORES. .....	12
FIGURA 6. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA ESTRUCTURA DE LOS CANALES DE POTASIO KV2.....	14
FIGURA 7. MODELO EN VISTA LATERAL DEL CANAL KV2.1 OBTENIDO A PARTIR DE CRIO-MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	14
FIGURA 8. PORCENTAJE DE SIMILITUD DE LOS CANALES KV2.1 Y KV2.2....	15
FIGURA 9. EL MECANISMO DE ACCIÓN DEL TEA. ....	17
FIGURA 10. DOMINIOS A LOS QUE SE UNEN LAS TOXINAS DE LOS CANALES KV2.....	18
FIGURA 11. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA METODOLOGÍA.....	31
FIGURA 12. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL ESQUEMATIZADO.....	31
FIGURA 13. GANANCIA DE PESO CORPORAL.....	34
FIGURA 14. EL TRATAMIENTO CON SACAROSA 20 % CONDUCE AL DESARROLLO DE OBESIDAD CENTRAL.....	35
FIGURA 15. LA GRASA PERIPANCREÁTICA Y EPIDIDIMAL AUMENTA DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON SACAROSA 20%.. ..	35
FIGURA 16. EL TRATAMIENTO CON SACAROSA AL 20 % DURANTE 8 SEMANAS PRODUCE RESISTENCIA A LA INSULINA.....	37
FIGURA 17. EL TRATAMIENTO CON SACAROSA 20 % INCREMENTA LOS NIVELES DE INSULINA Y TRIGLICÉRIDOS.....	37
FIGURA 18. LA DENSIDAD DE CORRIENTE NO CAMBIA DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON SACAROSA AL 20 %.. ..	40
FIGURA 19. CONTRIBUCIÓN DE LOS CANALES KV2.1 A LA CORRIENTE TOTAL DE K <sup>+</sup> EN CÉLULAS BETA CONTROL.....	41
FIGURA 20. CONTRIBUCIÓN DE LOS CANALES KV2.1 A LA CORRIENTE TOTAL DE K <sup>+</sup> EN CÉLULAS B TRATADAS.....	42
FIGURA 21. LA ACTIVACIÓN E INACTIVACIÓN EN ESTADO ESTABLE NO SE MODIFICAN CON EL TRATAMIENTO CON LA SACAROSA AL 20 %.....	43
FIGURA 22. LA EXPRESIÓN DEL CANAL KV2.1 NO CAMBIA DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON SACAROSA 20 %. .....	45

FIGURA 23. LA EXPRESIÓN DEL CANAL KV 2.2 NO CAMBIA DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON SACAROSA 20 %. ..... 46

### Índice de tablas

TABLA 1. CRITERIOS UTILIZADOS EN EL DIAGNÓSTICO DEL SÍNDROME METABÓLICO (SM) SEGÚN OMS, NCEP ATP III, Y FID.....	2
TABLA 2. PRODUCTOS DE LOS TIPOS CELULARES DE LOS ISLOTES PANCREÁTICOS..	6
TABLA 3. ACCIONES DE LA INSULINA EN EL HÍGADO, EL TEJIDO ADIPOSO Y EL MÚSCULO..	7
TABLA 4. CONSUMO DE AGUA Y ALIMENTO.....	33
TABLA 5. CUANTIFICACIÓN DEL CONSUMO CALÓRICO EN KILOCALORÍAS POR DÍA POR RATA.....	33

## Índice de abreviaturas

GSIS	Secreción de insulina estimulada por glucosa
SM	Síndrome metabólico
DM2	Diabetes Mellitus Tipo 2
ECV	Enfermedades Cardiovasculares
SNA	Sistema Nervioso Autónomo
SNP	Sistema Nervioso Parasimpático
SNS	Sistema Nervioso Simpático
ATP III	Panel de Tratamiento de Adultos
NCEP	Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol
NHLBI	Instituto Nacional del Corazón, los Pulmones y la Sangre
FID	Federación internacional de la Diabetes
OMS	Organización Mundial de la Salud
K <sub>ATP</sub>	Canales de potasio sensibles a ATP
K <sub>v</sub>	Canales de potasio dependientes de voltaje
C <sub>av</sub>	Canales de calcio dependientes de voltaje
Nav	Canales de sodio dependientes de voltaje
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
TEA	Tetraetilamonio
CTX	Caribdotoxina
HaTx	Hanatoxina
JZTX	Jingzhaotoxina
GxTx	Guanxitoxina

## Resumen

El síndrome metabólico (SM) es un conjunto de signos metabólicos que aumentan el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares (ECV) y diabetes mellitus tipo 2 (DM2). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), los signos que componen el SM son: obesidad central, dislipidemia (aumento en los niveles de triglicéridos en plasma y/o disminución en los niveles HDL), hipertensión, resistencia a la insulina, e hiperinsulinemia. La secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS) es un proceso complejo que involucra a diferentes tipos de canales iónicos, entre ellos los canales de potasio dependientes de voltaje Kv2. La actividad de estos canales contribuye a la repolarización del potencial de membrana y, con ello, al cese de la secreción de insulina. El papel de los canales de potasio Kv2 no ha sido estudiado en el contexto del SM, por lo tanto, se consideró importante determinar si los cambios en la actividad de estos canales podrían modificar la secreción de insulina.

En este trabajo se estudió la posible participación de los canales Kv2 en el mecanismo de hiperinsulinemia observada en el SM. Se utilizó un modelo de SM en ratas *Wistar* inducido con una dieta alta en sacarosa (20 % en el agua de bebida) durante 8 semanas y se midieron parámetros somatométricos y metabólicos. Se utilizaron cultivos primarios de célula  $\beta$  pancreática y se estudiaron a los canales Kv2 utilizando la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana (Patch-Clamp) en la modalidad de célula completa.

Los resultados mostraron que, después de 8 semanas de tratamiento con la sacarosa al 20 %, los animales desarrollan obesidad central, asociada con un incremento en la grasa peripancreática y gonadal, hipertrigliceridemia, hiperinsulinemia y resistencia a la insulina, al ser comparados con el grupo control. Al comparar las densidades de corriente, la dependencia en el voltaje de la activación y la inactivación, así como la expresión de canales Kv2 mediante fluorescencia, en células  $\beta$  pancreáticas provenientes de animales con SM y controles, no se encontraron diferencias entre ambos grupos. En conclusión los

canales de potasio dependientes de voltaje Kv2, no participan en el mecanismo de hiperinsulinemia observada durante las primeras etapas del SM.

## Abstract

Metabolic syndrome (MS) is a group of metabolic signs that increases the risk of develop cardiovascular disease (CVD) and type 2 diabetes mellitus (2DM). According to the World Health Organization, MS includes the presence of symptoms such as central obesity, dyslipidemia, hypertension, insulin resistance and hyperinsulinemia. Glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) is a complex process, which involves the activity of different ionic channels, including that of Kv2 voltage-gated potassium channels that contribute to the repolarization of the membrane potential and limit further insulin secretion. We highlight the idea that changes in the activity and/or expression of Kv2 potassium channels, whose role in MS has not been yet clarified, may contribute to alterations in insulin secretion. In this work, we characterized the electrophysiological properties of Kv2 channels and studied their activity on hyperinsulinemia-related mechanisms observed in MS. For this purpose, we used a Wistar rat metabolic-syndrome model, which were fed with a 20 % sucrose diet for eight weeks. We performed somatometric and metabolic measurements to characterize the presence of MS and used pancreatic  $\beta$  cells from primary cultures of control and MS animals. To study Kv2 channels from these cells, we used the Patch-Clamp technique in the whole-cell configuration. Our results show that, after eight weeks with a 20 % sucrose diet, the rats developed MS with central obesity, hypertriglyceridemia, insulin resistance and hyperinsulinemia, as compared to the control group, however, we did not observe differences in the current density nor in the voltage-dependence of activation and inactivation or in the expression levels of Kv2 channels between pancreatic  $\beta$  cells from control and MS animals. In conclusion, our results show that Kv2 channels may not participate in the hyperinsulinemia mechanism observed in MS.

# Introducción

## 1. Síndrome metabólico

El síndrome metabólico (SM) es un conjunto de signos y síntomas metabólicos que aumentan el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares (ECV) y diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (Kassi et al., 2011). Estos signos comprenden a la obesidad central, hipertensión, dislipidemia (aumento de triglicéridos y disminución de HDL), alteración de la glucosa en ayuno, hiperinsulinemia y resistencia a la insulina (Eckel et al., 2010; Hiriart et al., 2014).

La etiología de este síndrome no está clara, se sabe que factores genéticos y ambientales como dietas ricas en calorías, la falta de actividad física (Ning et al., 2021) y disruptores endocrinos contribuyen al desarrollo del síndrome (Xu et al., 2021).

El SM es un problema de salud pública y su prevalencia ha ido en aumento. En Estados Unidos la prevalencia del SM es del 33.7 % en la población hispana, observándose una mayor incidencia en mujeres (36 %) que en hombres (34 %) (Heiss et al., 2014; Rochlani et al., 2015). Mientras que en la población mexicana la prevalencia de SM es del 26.6 % teniendo mayor incidencia en hombres (28.5 %) que en mujeres (25.2 %) (Aguilar-Salinas et al., 2004).

El concepto de SM fue establecido por Reaven en 1988, que inicialmente lo llamó “síndrome X” y posteriormente fue renombrado como “síndrome metabólico”. A lo largo de los años, varias organizaciones han trabajado para definir el conjunto de criterios fisiológicamente relevantes que forman parte de la definición del SM, la primera en hacerlo fue la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1998, considerando que la resistencia a la insulina era central en la fisiopatología del SM. Posteriormente, en 1999, el Grupo Europeo para el Estudio de la Resistencia a la Insulina (EGIR) propuso una modificación al criterio de la OMS, requiriendo la presencia de hiperinsulinemia para el diagnóstico (P. L. Huang, 2009; Kassi et al., 2011).

El Panel de Tratamiento de Adultos III (ATP III) del Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol (NCEP) publicó sus criterios de diagnóstico en 2001, pero se actualizaron en 2005 por la Asociación Estadounidense del Corazón y la Asociación Nacional del Corazón, los Pulmones y la Sangre. Así, se propuso que se deben de cumplir al menos tres de los siguientes cinco criterios en el diagnóstico del SM: circunferencia de la cintura mayor 102 cm (hombres) o 88 cm (mujeres), presión arterial mayor a 130/85 mmHg, niveles de triglicéridos superiores a 150 mg/dl, nivel de colesterol HDL inferior a 40 mg/dl (hombres) o 50 mg/dl (mujeres) y alteración de la glucosa en ayuno (mayor o igual a 110 mg/dl) (Tabla 1) (Huang, 2009; Eckel et al., 2010; Kassi et al., 2011). La Federación Internacional de la Diabetes (FID) publicó en 2005 sus criterios de diagnóstico, y aunque incluye a los de las otras organizaciones, este además añadió el requerimiento de la presencia de obesidad central (Huang, 2009; Eckel et al., 2010; Kassi et al., 2011). En la tabla 1 se muestran los criterios de la OMS, NCEP ATP III y FID.

Factor de riesgo	OMS	NCEP ATP III	FID
<b>Obesidad central</b>	Relación cintura-cadera > 0.9 en hombres >0.85 en mujeres o IMC > 30 Kg/m <sup>2</sup>	Circunferencia abdominal >102 cm en hombres > 88 cm mujeres	Circunferencia abdominal ≥ 94 cm en hombres ≥ 80 cm en mujeres
<b>Triglicéridos</b>	≥ 150 mg/dl	≥150 mg/dl	≥150 mg/dl
<b>Colesterol HDL</b>	Hombres <35 mg/dl Mujeres < 39 mg/dl	Hombres < 40 mg/dl Mujeres < 50 mg/dl	Hombres < 40 mg/dl Mujeres < 50 mg/dl
<b>Presión sanguínea</b>	≥ 140/90 mmHg	≥ 130/85 mmHg	≥ 130/85 mmHg
<b>Alteración en la glucosa de ayuno</b>	≥ 110 mg/dl	≥ 110 mg/dl	≥ 100 mg/dl
<b>Resistencia a la insulina</b>	Clamp hiperinsulinémico-euglucémico*		

**Tabla 1. Criterios utilizados en el diagnóstico del Síndrome metabólico (SM) según OMS, NCEP ATP III, y FID.** IMC índice de masa corporal. \*Clamp hiperinsulinémico-euglucémico método de referencia para evaluar sensibilidad a la insulina. Tomado de (Aschner, 2010; P. L. Huang, 2009).

## 1.1. Modelos animales de síndrome metabólico

Existen diferentes modelos animales para el estudio del SM. El aumento en la cantidad de grasa o azúcar en la dieta, promueven el desarrollo de los signos que componen al SM. (G. C. Chen et al., 2011).

Las dietas ricas en sacarosa pueden inducir SM en rata, se ha observado que el tratamiento de machos posdestete con sacarosa al 30 % en el agua de bebida induce SM, con aumento de peso y de niveles plasmáticos de triglicéridos, asimismo, algunos animales presentaron aumento del tejido adiposo y cambios en la OGTT (prueba de tolerancia a la glucosa) (Aguilera et al., 2004).

Existen modelos en donde el SM es inducido mediante el uso de dietas ricas en sacarosa (12-30 %) o fructuosa (60 a 80 %), en ratas SHR (espontáneamente hipertensas), ratas Sprague Dawley o Wistar (Larqué et al., 2011).

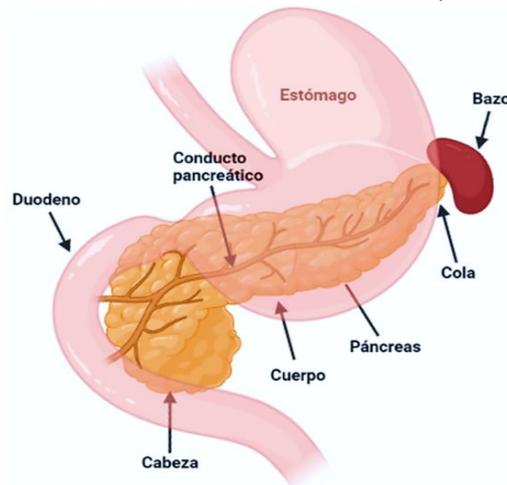
El desarrollo de SM en humanos se ha relacionado con la ingesta de bebidas azucaradas de consumo (Malik et al., 2006). Teniendo en cuenta que las ratas Wistar son un modelo que no presenta susceptibilidad a desarrollar diabetes y obesidad, en nuestro laboratorio se desarrolló un modelo de SM en ratas Wistar, mediante tratamiento de sacarosa al 20 % durante 8 (Larqué et al., 2011) y 24 semanas (Velasco et al., 2012). Al final del tratamiento, se observó aumento de peso, resistencia a la insulina, incremento de la concentración de triglicéridos, hiperinsulinemia, hipertensión y alteración de la glucosa en ayuno solo a las 24 semanas en estos animales, en comparación con el grupo control (Larqué et al., 2011; Velasco et al., 2012).

De acuerdo al criterio de NCEP ATPIII, se requieren al menos 3 de 5 signos para un diagnóstico positivo de SM (Kassi et al., 2011). Los animales bajo tratamiento con sacarosa al 20 % desarrollan SM ya que presentan 4 de los 5 signos, obesidad central, resistencia a la insulina, hipertrigliceridemia (dislipidemia) y alteración de la glucosa en ayuno (únicamente a las 24 semanas) (Larqué et al., 2011; Velasco et al., 2012). Estas alteraciones, no pueden ser estudiadas sin antes tomar en cuenta

la fisiología páncreas y de los islotes pancreáticos que con cruciales en el estudio del SM.

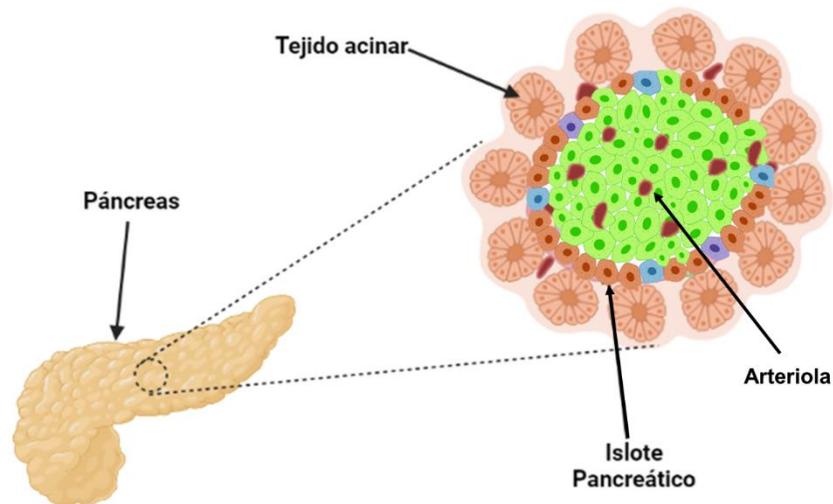
## 2. Páncreas e islotes pancreáticos

El páncreas es un órgano retroperitoneal blando, alargado y plano (Mahadevan, 2016) que se encuentra en la región superior izquierda, dentro de la cavidad abdominal, detrás del estómago, conectándose al duodeno (Röder et al., 2016). Se divide en tres partes principales: la cabeza (extremidad derecha) que colinda con el duodeno, el cuerpo (parte central) y la cola (extremidad izquierda) que limita con el bazo (Figura 1) (Mahadevan, 2016; Mark et al., 2018).



**Figura 1. Localización anatómica del páncreas.** El páncreas se ubica detrás del estómago y colinda el duodeno y el bazo. Se divide anatómicamente en la cabeza, el cuerpo y la cola. Modificado de (Boron & Boulpaep, 2017). Creado con BioRender.com.

El páncreas contiene dos componentes: el exocrino y el endocrino (Mahadevan, 2016). El componente exocrino o acinar (98 % de la glándula) está constituido por conductos y células acinares que secretan jugo pancreático rico en enzimas digestivas como la amilasa, la lipasa pancreática y el tripsinógeno. Estas enzimas son secretadas hacia el conducto pancreático principal y hacia el conducto pancreático accesorio (Röder et al., 2016). El componente endocrino (1 a 2 % de la glándula) contiene islotes pancreáticos que albergan células secretoras de hormonas que participan en la regulación de la homeostasis de la glucosa, además también contiene elementos vasculares y neurales (Figura 2) (Boron & Boulpaep, 2017).



**Figura 2. Componentes endocrinos y exocrinos del páncreas.** Tejido acinar (componente exocrino) constituye el 98 % de la glándula mientras que los islotes pancreáticos (componente endocrino) del 1 al 2 %. Creado con BioRender.com.

Los islotes pancreáticos se encuentran distribuidos al azar dentro del tejido acinar, con un rango de diámetro de 50-500  $\mu\text{m}$  en ratas y de 30 a >400  $\mu\text{m}$  en humanos (Figura 3) (Kilimnik et al., 2012; Bonner-Weir et al., 2015; Velasco et al., 2018; Jo, 2020; Huang et al., 2018). A su vez cada islote está constituido por aproximadamente 2000 células productoras de hormonas endocrinas. Estas incluyen a las células  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$  (pp) y  $\epsilon$ , las cuales secretan distintas hormonas como glucagon, insulina, somatostatina, polipéptido pancreático y ghrelina, respectivamente (Tabla 2) (Campbell & Newgard, 2021).

Cada islote pancreático está irrigado por arteriolas que se ramifican en diversos capilares (Dolenšek et al., 2015; Mark et al., 2018). Su irrigación va desde el centro hacia la periferia, en donde las hormonas secretadas por células centrales, pueden regular la secreción de las células periféricas a medida que la sangre circula (Boron & Boulpaep, 2017; Dolenšek et al., 2015).

Los islotes pancreáticos reciben inervación del sistema nervioso autónomo la cual regula la secreción de las hormonas mencionadas. La estimulación colinérgica del sistema nervioso parasimpático (SNP) incrementa la secreción de insulina, mientras que la estimulación adrenérgica del sistema nervioso simpático (SNS) puede tener un efecto estimulador o inhibitor sobre la secreción de insulina, dependiendo del

tipo de receptor adrenérgico (Boron & Boulpaep, 2017; Makhmutova & Caicedo, 2021).

Célula	Producto
$\alpha$	Glucagon
$\beta$	Insulina, proinsulina, péptido C, GABA, ghrelina y amilina
$\delta$	Somatostatina
$\gamma$ (pp)	Polipéptido pancreático
$\epsilon$	Ghrelina

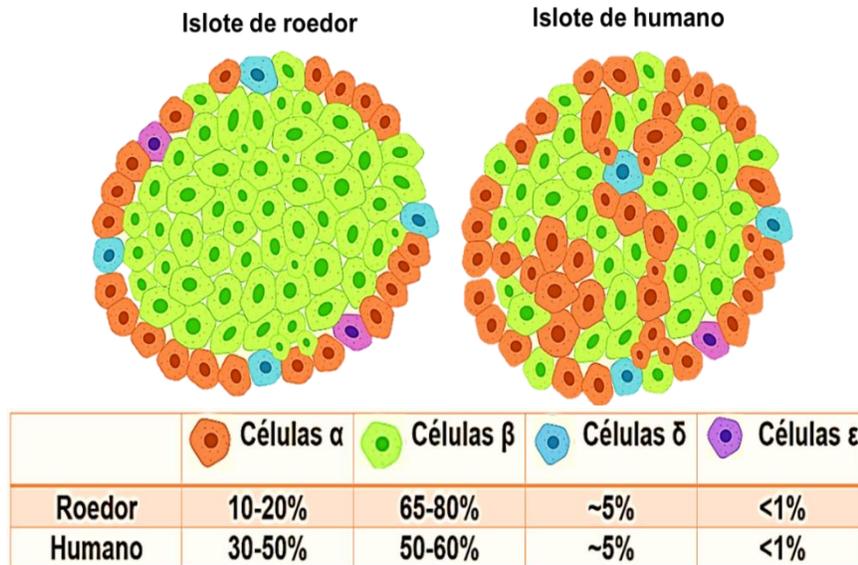
**Tabla 2. Productos de los tipos celulares de los islotes pancreáticos.** Tomado de (Campbell & Newgard, 2021).

### 2.1. Células $\beta$ pancreáticas e insulina

Las células  $\beta$  son las más abundantes en los islotes pancreáticos, aunque su porcentaje y distribución puede variar dependiendo de la especie. En los humanos representan entre el 50-60 % de las células y se distribuyen por todo el islote, mientras que en los roedores representan entre el 65-80 %, localizándose en el centro (Figura 3) (Campbell & Newgard, 2021). La insulina es sintetizada únicamente en las células  $\beta$  pancreáticas y además, es secretada junto con otros componentes presentes en los gránulos de insulina como lo son el péptido C, la trifosfato de adenosina (ATP), ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), ghrelina y amilina (Tabla 2) (Vakilian et al., 2019).

La insulina es una hormona anabólica que regula el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, a través de diferentes procesos en el organismo (Tabla 3) (Niswender, 2011). Su función principal consiste en mantener la homeostasis de la glucosa, mediante el aumento en la translocación de GLUT-4 a la membrana, misma que permite que la glucosa ingrese a los tejidos diana (Thevis et al., 2010).

La insulina también posee efectos mitogénicos que incluyen la división, diferenciación y crecimiento celular, así como la inhibición de la apoptosis (Bedinger & Adams, 2015).



**Figura 3. Comparación del porcentaje y distribución de los diferentes tipos de células en islotes de roedor y humano.** Islote de roedor (diámetro de 50-500  $\mu\text{m}$ ) e islote de humano (diámetro de 30 a >400  $\mu\text{m}$ ) cada uno con porcentajes distintos de células endocrinas. Modificado de (Campbell & Newgard, 2021).

Tejido	Acciones anabólicas Estimula	Acciones anticatabólicas Inhibe
<b>Hígado</b>	-Síntesis de glucógeno -Lipogénesis -Entrada de aminoácidos -Síntesis de proteínas	Producción de glucosa estimulada por glucagón.
<b>Adiposo</b>	-Transporte y oxidación de glucosa -Lipogénesis -Entrada de lipoproteínas (LPL) -Síntesis de glucógeno -Síntesis de proteínas	Lipólisis (lipasa sensible a hormonas).
<b>Músculo</b>	-Transporte de glucosa -Síntesis de glucógeno -Entrada de aminoácidos -Síntesis de proteínas -Lipogénesis	Proteólisis y liberación de aminoácidos.

**Tabla 3. Acciones de la insulina en el hígado, el tejido adiposo y el músculo.** (Niswender, 2011).

La secreción de insulina por las células  $\beta$  puede ser estimulada por diferentes nutrientes como la galactosa, manosa y cetoheptosas como la fructuosa. Además, algunos aminoácidos (arginina y leucina) y cetoácidos ( $\alpha$ -cetoisocaproato y  $\alpha$ -cetoglutarato) también son capaces de estimular débilmente la secreción de insulina. A pesar de que varios de estos nutrientes pueden inducir en la secreción de insulina, el principal secretagogo de insulina es la glucosa (Boron & Boulpaep, 2017).

### 3. Secreción de insulina estimulada por glucosa

Las células  $\beta$  son capaces de detectar cambios en los niveles de glucosa plasmática y liberar insulina en respuesta a estos cambios, manteniendo los niveles de glucosa en sangre (Campbell & Newgard, 2021). Durante el ayuno, cuando la concentración extracelular de glucosa es de 3 a 5.6 mM, estas células son eléctricamente silentes y tienen un potencial de membrana en reposo de -70 a -80 mV (Hiriart et al., 2014).

La secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS por sus siglas en inglés) se divide en eventos proximales (metabólicos) y distales (iónicos). El componente proximal incluye al transporte de glucosa, seguido de la vía glucolítica, el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa, lo que resulta en un aumento de la relación ATP/ADP que, a su vez, desencadena una cascada de eventos electroquímicos (evento distal) en donde participan diversos tipos de canales iónicos como los  $K_{ATP}$ , TRP,  $K_v$ , Nav, Cav (de los hablaremos más adelante) que culminan en el aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular y en la exocitosis de insulina a la sangre (Hiriart & Aguilar-Bryan, 2008).

#### 3.1. Eventos metabólicos

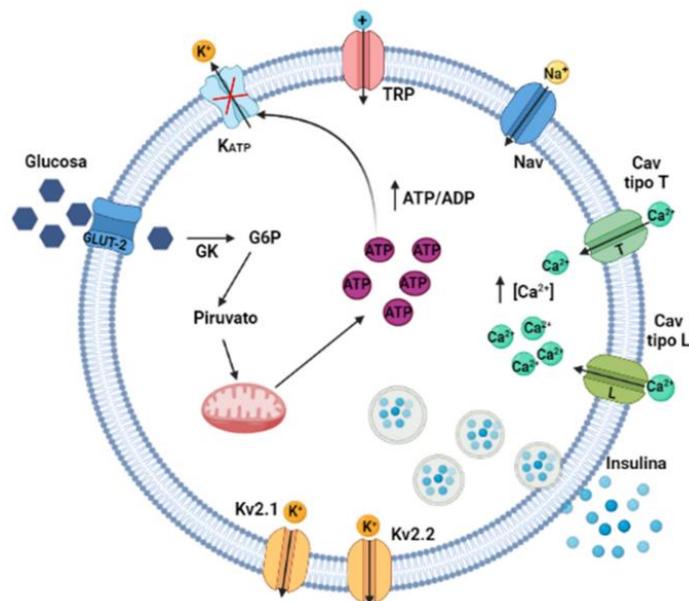
Cuando la concentración extracelular de glucosa incrementa a valores mayores a 7 mM, esta ingresa a la célula  $\beta$  a través del transportador GLUT2 en roedores ( $K_m = 11$  mM) y de GLUT1 y GLUT3 en humanos ( $K_m = 6$  mM) ya que estos transportadores aumentan su actividad en respuesta a incrementos en la concentración extracelular de glucosa (Newsholme et al., 2014).

Una vez dentro de las células, la glucosa es fosforilada por la enzima glucocinasa formando glucosa-6-fosfato y evitando su salida de la célula, así que se considera que este es un paso limitante en el metabolismo de la glucosa. La glucosa fosforilada sigue la vía glucolítica hasta formar piruvato, el cual ingresa al ciclo de Krebs en la mitocondria. Posteriormente los productos ingresan a la cadena de transporte de electrones, produciendo ATP. El aumento en la relación ATP/ADP propicia el cierre de los canales de potasio sensibles a ATP ( $K_{ATP}$ ) (los cuales vinculan al estado metabólico con la actividad eléctrica de la célula), impidiendo la salida de  $K^+$  (Figura 4)(Hiriart et al., 2014, 2015).

### 3.2. Eventos eléctricos

El cierre de los canales  $K_{ATP}$  evita el flujo de los iones de potasio al exterior de la célula  $\beta$ , aunado a esto los canales TRP (TRPM2, TRPM4 y TRPM5) permiten el paso de  $Ca^{2+}$  y  $Na^+$  al interior, conduciendo a una despolarización lenta del potencial de membrana hasta -40 mV (Hiriart et al., 2014). A este potencial de membrana, la probabilidad de apertura de los canales de  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  (tipo T) dependientes de voltaje aumenta, permitiendo la entrada de  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  a la célula, produciendo una despolarización rápida del potencial de membrana (Figura 4). Cuando el potencial de membrana alcanza un valor de alrededor de -20 mV, se activan los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L, lo que incrementa más la concentración de  $Ca^{2+}$  en la célula desencadenando la secreción de los gránulos que contienen insulina (Hiriart et al., 2014).

Finalmente, la repolarización del potencial de membrana se regula principalmente por la corriente de  $K^+$  activada por voltaje que es acarreada principalmente por los canales de la familia Kv2 (de los que hablaremos más adelante) que contribuyen del 60-70 % y los Kv1.4 del 20-30 % de las corrientes de  $K^+$  de las células  $\beta$  pancreáticas (Macdonald et al., 2001). Al activarse los Kv2, estas proteínas regresan el potencial de membrana al reposo, disminuyendo la actividad eléctrica de las células  $\beta$  que resulta en cese de la secreción de insulina (Figura 4) (Hiriart et al., 2014).



**Figura 4. Mecanismo de secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS).** La glucosa entra a la célula  $\beta$  a través de GLUT-2 en donde es metabolizada hasta la obtención de ATP, posteriormente los KATP se cierran conduciendo a la despolarización del potencial de membrana y a la apertura de canales TRP, Nav y Cav, culminando con el aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular y la secreción de insulina, finalmente la apertura de los canales Kv conduce a la repolarización del potencial de membrana y al cese de GSIS. Gk (glucocinasa), G6P (glucosa-6-fosfato), ATP (adenosina trifosfato), ADP (adenosina difosfato). Modificado de (Hiriart et al., 2014). Creado con BioRender.com.

### 3.3. Exocitosis de insulina

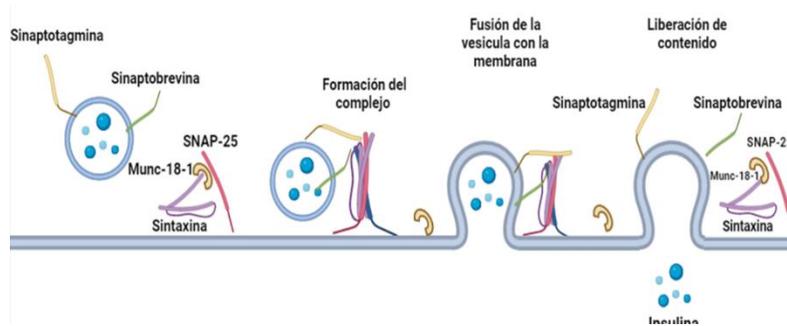
La secreción de insulina estimulada por glucosa ocurre de forma bifásica, la primera fase es rápida y de corta duración (~10 minutos); mientras que la segunda fase ocurre lentamente, hasta alcanzar una meseta, y dura tanto como dure el estímulo con glucosa (Vakilian et al., 2019). La secreción bifásica se debe a que hay 2 reservorios de gránulos secretores, aquellos que se encuentran anclados a la membrana (y son los primeros en liberarse) y aquellos que se encuentran alejados de la membrana, y que ante el estímulo de glucosa se translocan y se anclan a la membrana, fusionándose posteriormente (Gandasi et al., 2018).

Los gránulos secretores de insulina pasan por un proceso de exocitosis regulada, el cual se compone de tres etapas: acoplamiento, preparación y fusión. Durante el acoplamiento, las vesículas provenientes de Golgi se translocan y se anclan a

proteínas que facilitan la agregación de vesículas cerca de la membrana plasmática quedando así listas para fusionarse (Xiong et al., 2017; Vakilian et al., 2019; Gerber & Sudhof, 2002).

Durante la etapa de preparación, las proteínas del complejo SNARE (receptor soluble a proteínas unidas al factor N-metilmaleimida) syntaxina y SNAP-25 localizadas en la membrana plasmática (SNARE-t) y sinaptobrevina localizada en la vesícula de secreción (SNARE-v), que en ausencia del estímulo que promueve la secreción de insulina, se encuentran inactivas, cambian su conformación preparándose para la fusión vesicular. Por lo tanto, munc-18-1 que mantiene inactiva a la syntaxina se disocia permitiendo su unión con la SNAP-25, formando el complejo syntaxina/SNAP-25. Posteriormente se ensamblará con la proteína sinaptobrevina localizada en las vesículas secretoras (SNARE-v) (Gerber & Sudhof, 2002) (Figura 5).

En la etapa de fusión, el incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, activa a la sinaptotagmina (sensa de  $\text{Ca}^{2+}$ ) que a su vez permite un cambio conformacional del complejo syntaxina/SNAP-25, el reclutamiento y su unión con la sinaptobrevina. La unión de estas proteínas permite el acercamiento y fusión de las membranas vesicular y plasmática, liberando la insulina (Gerber & Sudhof, 2002; Vakilian et al., 2019). Una vez que la insulina se secreta a la sangre portal, llega en primer lugar al hígado, donde la mitad de la insulina se une a receptores, ejerciendo las acciones antes mencionadas. La insulina libre, que no es utilizada en el hígado, es irrigada al resto de los tejidos (por ejemplo músculo esquelético y tejido adiposo), en donde produce los efectos antes mencionados al unirse con su receptor (Boron & Boulpaep, 2017) (Figura 5).



**Figura 5. Exocitosis de gránulos secretores de insulina.** Las vesículas provenientes de Golgi son ancladas a la membrana plasmática. Posteriormente, las proteínas del complejo SNARE se preparan, Munc-18-1 se separa de sintaxina. El incremento en la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular es detectado por sinaptotagmina, promoviendo la unión de sintaxina, SNAP-25 y sinaptobrevina. La unión de las proteínas SNARE promueve la fusión de las vesículas a la membrana plasmática y la posterior liberación de insulina. Creado con BioRender.com. Modificado de (Gerber & Sudhof, 2002).

#### 4. Canales de potasio activados por voltaje Kv2

La familia de canales de potasio activados por voltaje (Kv) se compone de 12 subfamilias (Kv1-Kv12). La subfamilia 2 de canales de  $K^+$  activados por voltaje (Kv2) está integrada por dos miembros Kv2.1 y Kv2.2, codificados por los genes KCNB1 (en el brazo largo del cromosoma 20) y KCNB2 (en el brazo largo del cromosoma 8), respectivamente (González et al., 2012). Ambos canales se expresan en las membranas de las células  $\beta$  pancreáticas. Anteriormente se pensaba que el canal Kv2.2 se encontraba solo en células  $\delta$  y no en células  $\beta$  (Yan et al., 2004), sin embargo, ahora se sabe que Kv2.2 está presente en células  $\beta$  y en células  $\alpha$  de los islotes pancreáticos (Jensen et al., 2013).

Ambos canales conducen una corriente rectificadora tardía y son capaces de regular la secreción de insulina, ya que contribuyen a la repolarización y determinan la duración del potencial de acción, además, pueden interactuar directamente con las proteínas SNARE de membrana SNAP-25 y sintaxina-1A (Michaevlevski et al., 2003; Fu et al., 2017).

Los islotes pancreáticos de ratones C57BL/6 y knockout para Kv2.1 estimulados con glucosa, producen cambios en su actividad eléctrica. Los islotes provenientes de ratones knockout producen potenciales de acción que tardan más tiempo en

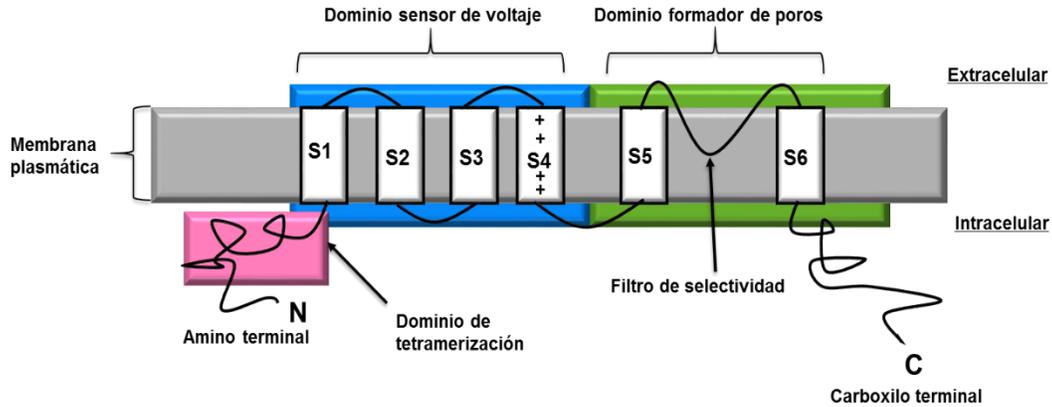
repolarizarse, lo que se ha asociado con un incremento en la secreción de insulina (Jacobson et al., 2007).

#### 4.1. Estructura de los canales Kv2

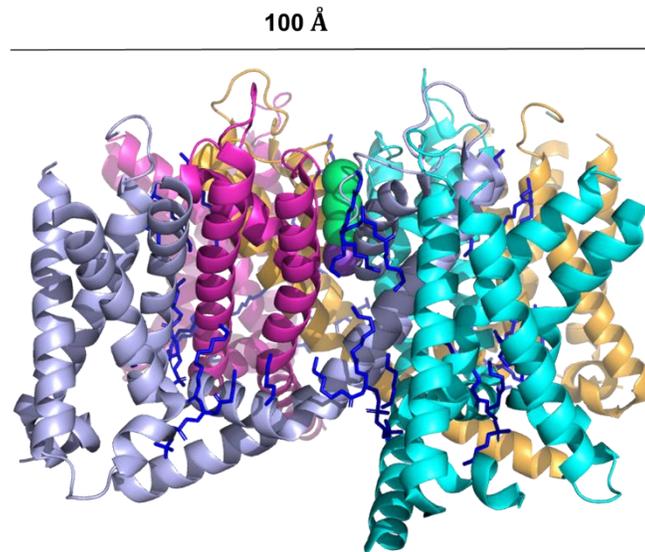
Los canales de potasio Kv2 son proteínas transmembranales constituidas por cuatro subunidades  $\alpha$  (Gravagna & Ribera, 2009), esta conformación tetramérica es crucial para que estos canales sean funcionales (González et al., 2012). Cada una de estas subunidades  $\alpha$  está conformada por seis segmentos transmembranales (S1-S6) (Yang et al., 2014) (Figura 6 y 7). Además, los canales Kv2 poseen subunidades auxiliares  $\beta$  que pueden regular su función y tráfico hacia la membrana (Mathie et al., 2010), como las Kv $\beta$  (Kv $\beta$ 1-Kv $\beta$ 4) (Nagaya & Papazian, 1997; O'Grady & Lee, 2005) y KChAP (Kuryshv et al., 2000).

Los segmentos transmembranales S1-S4 constituyen al dominio sensor del voltaje, que se caracteriza por poseer múltiples residuos de arginina (cargados positivamente) en el S4. Los segmentos S5-S6 conforman al dominio del poro (Yang et al., 2014), en donde se encuentra el filtro de selectividad al K<sup>+</sup> en la parte extracelular del poro. La compuerta de activación del poro en estos canales regula la apertura y el cierre de estas proteínas y su función está acoplada al dominio sensor del voltaje (González et al., 2012).

Las regiones amino (N) y carboxilo terminales (C) se ubican en la parte intracelular del canal (Figura 6). En la región N terminal se encuentra el dominio de tetramerización (T1) (Yang et al., 2014), que determina la especificidad del ensamblaje de las subunidades. Además, mantiene estable al tetrámero, y sirve como plataforma para la unión de las subunidades  $\beta$  regulatorias y para las interacciones proteína-proteína. El extremo C terminal es la porción más larga de la proteína y puede modificar las propiedades de activación e inactivación del canal (Yellen, 2002).



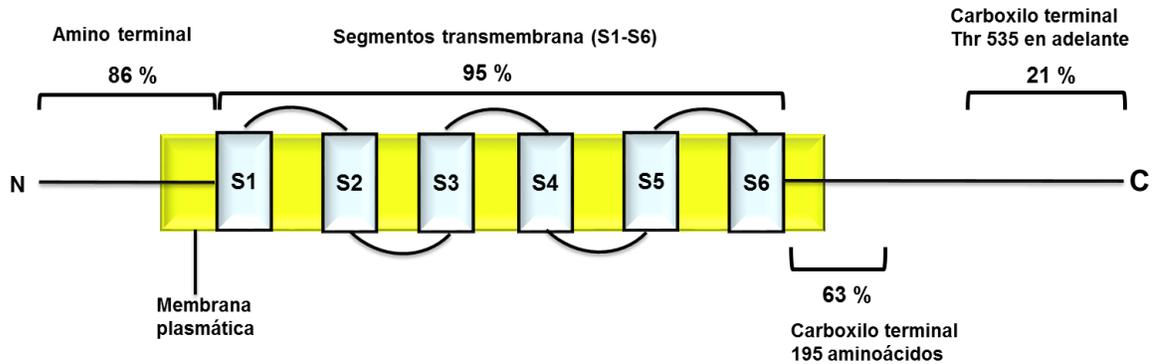
**Figura 6. Representación esquemática de la estructura de los canales de potasio Kv2.** Conformada por el dominio sensor de voltaje constituido por los segmentos transmembrana (S1-S4), el dominio del poro (S5-S6), donde se localiza el filtro de selectividad al  $K^+$ . Los dominios amino (N) y carboxilo terminal (C) son intracelulares. Tomado y modificado de (Yellen, 2002).



**Figura 7. Modelo en vista lateral del canal Kv2.1 obtenido a partir de criomicroscopía electrónica.** Cada subunidad es mostrada en diferentes colores, la densidad iónica de  $K^+$  se muestra en esferas verdes. PDB 8SD3 obtenido de (Fernández-Mariño et al., 2023).

En toda su estructura, la similitud de Kv2.1 (857 aminoácidos) y Kv2.2 (907 aminoácidos) es del 67 %. El análisis de individual de las regiones de estos dos canales indica que existe 86 % de homología entre las regiones N terminales, 95 % de homología entre los segmentos transmembranales (S1-S6) (Frech et al., 1989; Hwang et al., 1992) y, en sus extremos C terminales, Kv2.1 y Kv2.2 presentan 63

% de homología entre los primeros 195 aminoácidos, pero a partir de la treonina 535 (región distal), el canal Kv2.1 muestra un 21 % homología con respecto al Kv2.2 (Figura 8) (Fink et al., 1996; Kihira et al., 2010).



**Figura 8. Porcentaje de similitud en la secuencia de los canales Kv2.1 y Kv2.2.** Ambos canales tienen una alta homología en su extremo N terminal (86 %) y entre sus segmentos transmembrana S1-S6 (95 %). Los canales Kv2 son diferentes en el extremo C terminal con homología del 63 % en los primeros 195 aminoácidos y del 21 % en la última parte de este. Amarillo: membrana plasmática (Fink et al., 1996).

Las diferencias en los extremos carboxilo terminal de estos canales les permiten interactuar diferencialmente con otras proteínas. La estructura de Kv2 difiere a la de otros canales Kv, ya que su carboxilo terminal es más largo, conformando cerca de 50 % de longitud de las subunidad  $\alpha$  (Jensen et al., 2013).

De los 2 miembros de la familia Kv2, el canal Kv2.1 ha sido más estudiado. Originalmente, se pensaba que era el único de la familia presente en células  $\beta$ , debido a su contribución a las corrientes de  $K^+$ . El truncamiento de la región del poro de Kv2.1, produce canales no funcionales sin conducción iónica, lo cual resultó en una disminución del 60 % en las corrientes de  $K^+$  en las células  $\beta$  de rata, demostrando la contribución de este canal a estas corrientes (Macdonald et al., 2001).

El uso de siRNA ha permitido estudiar a los canales Kv2.1 y Kv2.2 y así confirmar la presencia de Kv2.2 en células  $\beta$ . El silenciamiento de ambos canales disminuye la corriente acarreada por cada uno de estos, lo que indica que tanto Kv2.1 como Kv2.2 participan en la corriente rectificadora tardía de  $K^+$  en células  $\beta$  de humano (Fu et al., 2017).

## 4.2. Propiedades biofísicas y farmacológicas

### Selectividad de los canales de potasio

Los canales de potasio poseen un poro altamente selectivo que permite flujos de  $K^+$  desde los  $10^6$ - $10^8$  iones/s (3 pS ~ 300 pS). Todos los canales Kv tienen una secuencia conservada de siete residuos de aminoácidos (TTVGYGD) que forman el filtro de selectividad (González et al., 2012).

Esta secuencia en el filtro de selectividad es crítica, ya que las mutaciones en alguno de sus aminoácidos interrumpen la capacidad del canal para discriminar entre iones de  $K^+$  y  $Na^+$ . Normalmente el margen con el que se selecciona  $K^+$  sobre  $Na^+$  es de  $10^4$  (Heginbotham et al., 1994).

### Mecanismos de activación e inactivación

Los canales iónicos activados por voltaje conducen iones tras una despolarización de la membrana. Lo anterior se debe a que en el dominio sensor de voltaje, el segmento S4 que contiene 4 o más residuos de arginina y lisina, los cuales se desplazan por el movimiento del S4 ante los cambios en el potencial de membrana, conduciendo a un cambio conformacional en la compuerta y permitiendo que el canal transite del estado cerrado al abierto (Aggarwal & MacKinnon, 1996; Bezanilla, 2005). Sin embargo, durante despolarizaciones prolongadas, los canales Kv2 cambian su conformación y se inactivan (estado abierto no conductor) (Yellen, 2002).

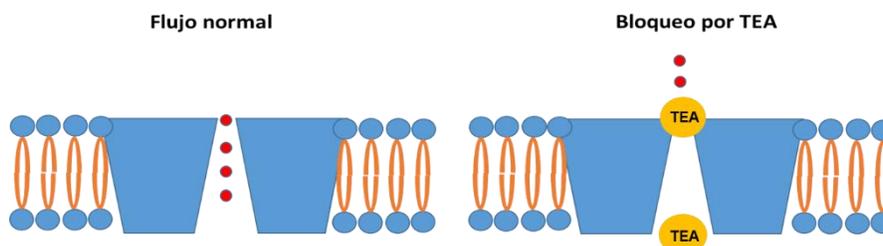
Los canales Kv, presentan tres mecanismos por los cuales pueden dejar de conducir iones, el estado cerrado y dos estados inactivos que ocurren después de despolarizaciones prolongadas. El primero es el mecanismo de cierre, en este el canal puede cerrarse ocluyendo la entrada intracelular evitando el flujo de iones (Liu et al., 1997; Del Camino & Yellen, 2001). Lo que ocurre es que la compuerta intracelular o segmentos S6, obstruyen la entrada desde la superficie citoplásmica hasta la cavidad interna del canal, los extremos extracelulares de los segmentos S6 forman una cuna para el filtro de selectividad, mientras que los extremos

intracelulares convergen en un cruce debajo de la cavidad intracelular del canal (Del Camino & Yellen, 2001).

El segundo es un mecanismo de inactivación conocido como inactivación de tipo N o mecanismo de bola y cadena, que consiste en la unión de un péptido auto-inhibidor que involucra el extremo N el cual obstruye el paso de iones a través del poro (Rettig et al., 1994). El tercero es conocido como inactivación de tipo C, en el cual el filtro de selectividad a través de cambios conformacionales impide la entrada de iones, este proceso es más lento que la inactivación de tipo N (Hoshi et al., 1991; Yellen, 2002).

### *Regulación farmacológica de los canales Kv2*

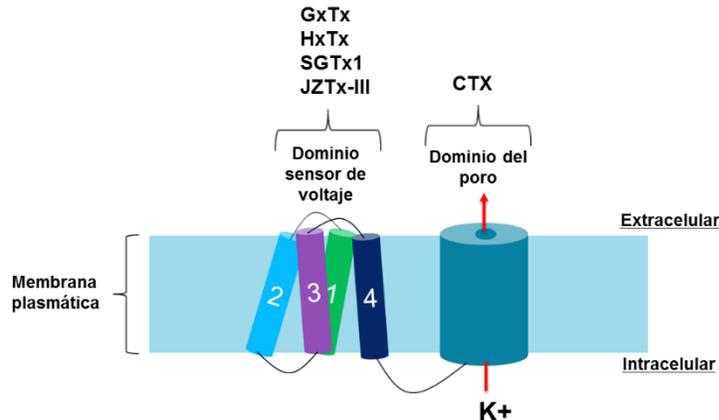
El flujo de iones a través de los canales de potasio Kv2 puede inhibirse por toxinas y/o bloqueadores. Un bloqueador clásico de todos los canales de potasio, es el tetraetilamonio (TEA), el cual bloquea al canal por ambos lados de la membrana en sitios distintos (Figura 9), los aminoácidos que interactúan con el TEA se ubican en la parte interna y externa del filtro de selectividad (Doyle et al., 1998). En las células  $\beta$  pancreáticas el TEA bloquea el flujo de canales Kv2 a concentraciones de 20 mM incrementando la entrada de  $Ca^{2+}$  a la célula (Macdonald et al., 2001; MacDonald et al., 2002).



**Figura 9. El mecanismo de acción del TEA.** El TEA bloquea el flujo de potasio por obstrucción directa en la caras externa e interna del canal (Yuk Man Leung, 2012).

Las toxinas que inhiben el flujo iónico de  $K^+$  se pueden agrupar según el dominio con el que interactúan y sus mecanismos de acción. La primera clase de toxinas inhiben el flujo de iones  $K^+$  uniéndose a la cavidad externa del poro de conducción. La segunda clase interactúa con el dominio sensor de voltaje y modifica la cinética de activación del canal (Figura 10) (Yuan et al., 2007).

El veneno de tarántula contiene toxinas que interactúan con el dominio sensor de voltaje de canales Kv modificando la apertura de la compuerta del canal. Las toxinas de escorpión también pueden afectar a los canales, un ejemplo es la Caribdotoxina (CTX) la cual se une al dominio del poro en canales  $KCa^{2+}$  (Figura 10) (Lee et al., 2010).



**Figura 10. Dominios a los que se unen las toxinas de los canales Kv2.** Las toxinas de escorpión como la Caribdotoxina (CTX) se unen al vestíbulo exterior del poro; las toxinas de tarántula como la Hanatoxina (HaTx), SGTx1, Jingzhaotoxina (JZTX-III) y Guanxitoxina (GxTx-1E) se unen al dominio sensor de voltaje. Modificado de (Swartz, 2008).

Se ha observado que algunas toxinas de tarántula como HaTx1, GxTx, SGTx1 y JZTX-III se unen al dominio de detección de voltaje de los canales Kv2 y modifican la activación dependiente de voltaje. Sin embargo, SGTx1 y JZTX-III tienen una afinidad relativamente baja ( $2.7 \mu\text{M}$  y  $430 \text{ nM}$  respectivamente) (Lee et al., 2010), además, pueden llegar a interactuar con canales de  $\text{Na}^+$  o  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje, lo que no las hace buenas candidatas como inhibidores específicas de Kv2 (Bosmans et al., 2008; Xiao et al., 2004).

Otras toxinas como la HaTx1 tienen una afinidad relativamente alta ( $\sim 1 \mu\text{M}$ ), y se ha utilizado para el estudio de la fisiología de las células  $\beta$ , en donde se ha observado que inhibe la corriente de los canales Kv2.1 (Tamarima et al., 2005). Sin embargo, la síntesis química y plegamiento de esta toxina es complicado, lo que limita su uso (Lee et al., 2010).

La GxTx-1E es el inhibidor más potente del canal Kv2.1 (Herrington et al., 2006). Esta toxina se une a la secuencia de aminoácidos extracelular que une el segmento

transmembrana 3 y 4 del dominio sensor de voltaje, ya que se ha observado que mutaciones en estos sitios debilitan la afinidad de la toxina (Lee et al., 2010).

La toxina GxTx-1E inhibe la corriente de los canales Kv2.1 tanto en células  $\beta$  pancreáticas de ratón como de rata, cambiando la dependencia de voltaje de la activación hacia potenciales más positivos, lo que ha convertido a esta toxina en una buena candidata para el estudio de los canales Kv2.1. En el caso de los canales Kv2.2, no se han identificado inhibidores específicos (Herrington, 2007).

#### 4.3. Regulación endógena de los canales de potasio Kv2.1

El entorno lipídico de la membrana, el medio intracelular y el entorno extracelular son importantes para el comportamiento de los canales Kv2.1, de hecho, en las células  $\beta$  pancreáticas, estos canales están sujetos a una diversa gama de mecanismos de regulación. Estos canales se sitúan en balsas lipídicas ricas en colesterol, y el agotamiento de estas disminuye notablemente la conductancia de  $K^+$  y altera las propiedades de compuerta de estos canales, lo que aumenta la secreción de insulina (Xia et al., 2004).

Kv2.1 es sensible a la temperatura y al estado redox. Cuando se hacen registros de corriente en configuración de célula completa a temperatura ambiente (22 °C), estos canales muestran una inactivación lenta, sin embargo, exhiben una inactivación más rápida a temperaturas cercanas a las fisiológicas (32-35 °C). En otros canales, como los canales de sodio, la recuperación desde el estado inactivo es más rápida a 33°C que a 23°C. El aumento del estado redox intracelular mediante un aumento de la relación NADPH/NADP<sup>+</sup> también facilita su inactivación (Nagatomo et al., 1998; MacDonald et al., 2003)

El canal Kv2.1 contienen 76 residuos de serina, 36 de treonina y 13 de tirosina en sus regiones N y C terminales. Muchos de estos residuos se han predicho como potenciales sitios de fosforilación de proteínas cinasas (Mohapatra et al., 2007). Estos sitios pueden regular las propiedades biofísicas de los canales como, por ejemplo su potencial de activación pero también a sus niveles de expresión en la

membrana y, por ende, a la densidad de la corriente saliente de  $K^+$  (Gravagna & Ribera, 2009).

El tráfico de los canales Kv2.1 se encuentra regulado a través del control del tráfico de vesículas que los contienen. Estas transitan del retículo endoplásmico hasta el sitio de inserción en la membrana plasmática (Gravagna & Ribera, 2009), en donde forman clústers de 6 a 12 canales, que facilitan la exocitosis de la insulina. De hecho Kv2.1 pero no Kv2.2 forman clústers, debido a que el truncamiento de los últimos 318 aminoácidos del carboxilo terminal de Kv2.1 impide su formación; además solamente Kv2.1 interactúa con el complejo sintaxina 1A/SNAP-25 lo que promueve la exocitosis de gránulos de insulina (Fu et al., 2017).

## 5. Antecedentes

Como se mencionó anteriormente en el mecanismo de secreción de insulina estimulada por glucosa, participan diferentes tipos de canales iónicos y enzimas del metabolismo glucolítico. Es probable que los mecanismos que conducen a la hipersecreción de insulina durante el SM involucren a las enzimas del metabolismo glucolítico, canales iónicos ( $K_{ATP}$ , Cav, Nav y Kv) que participan en el mecanismo de GSIS. De manera que, un mayor flujo de  $Ca^{2+}$  así como un mayor tiempo de repolarización mediado por los canales Kv; alteraciones en la actividad de estos podrían propiciar la hiperfunción de las células  $\beta$  durante el SM (Jacobson et al., 2007; Ruiz, 2018).

El aumento en la secreción de insulina y los cambios en la sensibilidad de canales iónicos debido a sobreestimulaciones prolongadas con carbohidratos, eventualmente conduce a que las células  $\beta$  secreten menos insulina (a través de mecanismos que aún no se conocen) siendo incapaces de mantener los niveles de glucosa en sangre (Nolan & Prentki, 2019)

Algunos grupos han realizado estudios transversales en humanos, y han reportado que al inicio de la Diabetes Mellitus tipo 2 la capacidad secretora de las células  $\beta$  disminuye, pasando de secretar una gran cantidad de insulina a secretar menos insulina (Ferrannini et al., 2005; Erion & Corkey, 2018).

Nuestro laboratorio ha sido pionero en el estudio de los efectos de SM sobre los canales iónicos de células  $\beta$ , utilizando ratas tratadas con sacarosa al 20 % durante 8 semanas. En dichos animales hemos observado que el SM no afecta la sensibilidad al ATP en los canales  $K_{ATP}$  (Cruz-cruz et al., 2022) y que no hay diferencias en las corrientes de  $Na^+$  en ambos grupos. Sin embargo, las corrientes de  $Ca^{2+}$  son mayores en el grupo tratado lo que podría contribuir a la hiperinsulinemia observada (Ruiz, 2018). A las 8 semanas de tratamiento se observó aumento en la masa de células insulares y en la cantidad de GLUT2, que también podrían contribuir a la hiperinsulinemia de nuestro modelo (Larqué et al., 2011).

En trabajos previos, al evaluar los efectos a largo plazo del tratamiento con sacarosa al 20 % durante 24 semanas, se observó que la sensibilidad de los canales  $K_{ATP}$  al ATP aumenta, indicando que los canales  $K_{ATP}$  se cierran a concentraciones más bajas de ATP. Este aumento en la sensibilidad de los canales  $K_{ATP}$  conlleva a una mayor secreción de insulina, lo cual explica en parte la hiperinsulinemia observada durante el SM. Además, se encontró que el 15 % de las células tienen una densidad de corriente de  $Ca^{2+}$  mayor en comparación con el grupo control, lo cual también contribuye a la hiperinsulinemia observada a este tiempo de tratamiento (Velasco et al., 2012).

## Planteamiento del problema

La función de los canales Kv2 pancreáticos se ha estudiado en condiciones fisiológicas. Sin embargo, se desconoce el papel de dichos canales en la fisiopatología del síndrome metabólico. El estudio de la actividad de los canales de potasio Kv2 en dicha patología pretende dilucidar su contribución a la hiperinsulinemia observada en el síndrome metabólico.

## Hipótesis

Durante el síndrome metabólico la corriente rectificadora tardía acarreada a través de los canales de potasio dependientes de voltaje Kv2 disminuirá en células  $\beta$  pancreáticas, contribuyendo a la hiperinsulinemia observada.

## Objetivos

### General

Analizar los efectos del síndrome metabólico sobre las propiedades biofísicas de los canales de potasio dependientes de voltaje Kv2, y la contribución de estos al aumento en la secreción de insulina

### Particulares

**1)** Caracterizar al síndrome metabólico a los dos meses de tratamiento con sacarosa al 20 % mediante las siguientes mediciones:

- Pruebas de tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina
- Parámetros somatométricos
- Cuantificación de niveles plasmáticos de insulina y triglicéridos

**2)** Comparar en células  $\beta$  pancreáticas control y con síndrome metabólico:

- Densidad de corriente
- Dependencia de voltaje de la activación en estado estable
- Dependencia de voltaje de la inactivación en estado estable

**3)** Analizar la expresión de los canales Kv2.1 y Kv2.2 en células  $\beta$  pancreáticas control y con síndrome metabólico

## Metodología

### Modelo de SM en rata

El desarrollo del modelo de SM se llevó a cabo de acuerdo con lo descrito previamente en el laboratorio (Larqué et al., 2011; Velasco et al., 2012). Se utilizaron ratas *Wistar* machos adultos jóvenes, con un peso entre 250-280 g (de aproximadamente 2 meses de edad), las cuales proporcionó el bioterio del Instituto de Fisiología Celular (IFC), UNAM. Las ratas se mantuvieron en ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, a 20-23 °C y 40 % de humedad relativa.

Los animales se dividieron aleatoriamente en dos grupos:

- 1) Ratas control a las cuales se les proporcionó agua simple para beber (control).
- 2) Ratas que tuvieron acceso a una solución de sacarosa al 20 % (p/v) en el agua de bebida (sacarosa 20%).

Ambos grupos se alimentaron con una dieta estándar para roedor (LabDiet Rodent 5001) con una composición de 28.5 % de proteína, 13.5 % de grasa y 58 % de carbohidratos) *ad libitum* durante ocho semanas.

Todos los animales se mantuvieron y utilizaron de acuerdo con las reglas del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del IFC, UNAM (número de protocolo: MHU188-22), basados en “International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals” por el Consejo para la Organización Internacional de Ciencias Médicas, 2010.

### Caracterización del modelo

Todas las mediciones y experimentos se realizaron en ratas con un ayuno de 12 horas, después de este periodo se retiró la dieta estándar y la solución de sacarosa al 20 % se reemplazó por agua corriente. Al final del tratamiento, los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (40 mg/Kg de peso) y la eutanasia se aplicó

con sobredosis de pentobarbital sódico (100-150 mg/Kg). Posteriormente, se obtuvieron muestras de sanguíneas de la vena cava inferior, en tubos con heparina, para los posteriores análisis de insulina y triglicéridos en plasma. También se disecaron el páncreas, los tejidos adiposo blanco peripancreático y epididimal.

### 1. Pruebas de tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina

En la semana 7, a los animales de ambos grupos experimentales (previamente ayunados por 12 h), se les realizaron pruebas de tolerancia a la glucosa mediante la administración intraperitoneal de glucosa (2 g/Kg de peso) y pruebas de sensibilidad a la insulina con la administración intraperitoneal de insulina (0.2 UI/Kg de peso).

Se cuantificó la concentración de glucosa en sangre periférica obtenida de la cola de los animales mediante el uso de un glucómetro. Las determinaciones se realizaron antes de la administración de las dosis de glucosa o insulina (tiempo cero) y a los 15, 30, 60, 90, y 120 minutos posteriores a la administración.

### 2. Parámetros somatométricos

Cada semana, durante las 8 semanas de tratamiento, se obtuvo el peso corporal de los animales y se determinaron el consumo de alimento y de agua totales. Al finalizar el tratamiento, los animales fueron anestesiados y se midieron el peso corporal, la circunferencia abdominal (región abdominal justo por encima de la cresta iliaca), y la longitud corporal (desde la punta de la nariz hasta el ano) con una cinta métrica. Adicionalmente, se extrajo y pesó el depósito de tejido adiposo epididimal y peripancreático.

### 3. Cuantificación de niveles plasmáticos de insulina y triglicéridos

De la vena cava inferior se obtuvieron muestras sanguíneas en tubos heparinizados, para medir los parámetros metabólicos, se centrifugaron a 2000 rpm durante 15

minutos a una temperatura de 4°C. El plasma se colectó y almacenó a -20°C hasta su posterior uso en la cuantificación de niveles de insulina y triglicéridos.

La cuantificación de triglicéridos plasmáticos se llevó a cabo por medio de una prueba colorimétrica de glicerol fosfato oxidasa y fenol 4-amina anti-pireno peroxidasa (GOP-PAP) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los niveles de insulina se cuantificaron por medio de un ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se prepararon la enzima conjugada 1X, el buffer de lavado 1X y las muestras a usar para el ensayo. La placa de 96 pozos fue puesta a temperatura ambiente por una hora. Después se agregaron 25 µL del blanco, los calibradores (con 5 diferentes concentraciones), y muestras en cada pozo, por duplicado. Posteriormente, se agregaron 100 µL de la enzima conjugada 1X a cada pozo y se incubó en un agitador de placas (45 rpm) por dos horas a temperatura ambiente. Después de la incubación, se lavó la enzima conjugada con 350 µL de buffer de lavado por pozo, se desechó y agregó nuevamente el buffer de lavado, lo anterior se repitió 5 veces.

Una vez terminados los lavados se agregaron 200 µL de sustrato de la enzima a cada pozo, y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 50 µL de la solución stop. Por último, se leyó la densidad óptica a 450 nm con agitación de 5 segundos antes de la lectura. Para determinar los niveles de insulina en cada muestra se promedió la densidad óptica medida y se extrapolaron los valores a partir de una curva estándar. En la curva estándar se graficó el promedio de la densidad óptica en cada calibrador con respecto a su concentración conocida, y se ajustaron los datos a una regresión polinomial.

### Cultivo primario de células insulares

Previo al aislamiento de los islotes pancreáticos, a los animales anestesiados se les realizó incisión en V desde el área genital hasta las costillas, cortando primero a través de la piel y luego a través de la pared muscular y el peritoneo para exponer la cavidad abdominal. Después, se separó el hígado para exponer al páncreas y al conducto pancreático que atraviesa al páncreas hasta que ingresa al duodeno. Con

unas pinzas hemostáticas se pinzó al conducto pancreático en el punto de entrada al duodeno, después se hizo una pequeña incisión en el conducto hepatopancreático, lo más cerca posible del hígado y, luego se insufló el páncreas usando un catéter conectado a una jeringa con solución salina balanceada de Hank (HBSS, por sus siglas en inglés).

Se diseccionó el páncreas insuflado, cortando primero la grasa circundante y luego la parte adherida al duodeno (cabeza), finalmente se separó la parte conectada al bazo (cola). El páncreas se colocó en solución HBSS para enjuagar el exceso de sangre. Los páncreas fueron colocados en una gasa estéril y se retiraron los restos de grasa, vasos sanguíneos y todo aquello que no fuese páncreas. El tejido pancreático se cortó en pedazos pequeños y se colocó en una solución colagenasa.

Los islotes pancreáticos se aislaron y separaron del tejido acinar mediante digestión con colagenasa (0.3 mg/ml) en HBSS, en baño maría a 37°C y con agitación durante 5 minutos. Posteriormente, los islotes se colectaron manualmente en una caja de Petri negra (35 mm x 10 mm), utilizando un microscopio estereoscópico. Los islotes se digirieron mediante incubación con una solución Spinner libre de  $Ca^{2+}$ , 10 mM glucosa, 0.5 % de albumina bovina sérica y tripsina (25 mg/ml), durante 3 minutos a 37°C, seguido de dispersión mecánica con una pipeta de vidrio tratada con poli-L-lisina.

Finalmente, las células aisladas se sembraron en cubreobjetos previamente tratados con poli-L-lisina y en medio RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal (FBS al 10 %), glutamina 1 %, penicilina 1 G 200 unidades/ml, estreptomicina 200 µg/ml y anfotericina B 0.5 µg/ml durante toda una noche para su posterior uso (Velasco et al., 2018).

### Caracterización electrofisiológica

El registro de corrientes macroscópicas se obtuvo usando la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana (patch-clamp) (Hamill et al., 1981) en la configuración de célula completa (whole-cell), a temperaturas entre 20°C - 22°C. Los registros se realizaron usando un amplificador Axopatch 200A (Axon

Instruments) conectado a un convertidor Digidata 1322A A/D (Axon Instruments). La resistencia en serie se compenso en un 70% (la máxima posible sin que oscilara el circuito). La adquisición de datos se realizó con el software Clampex (versión 8.0 de Axon Instruments) y el análisis con Clampfit (versión 9.0 de Axon Instruments). Las corrientes se filtraron a 5 kHz y muestreadas a 10 kHz.

Se usaron tubos capilares Kimax - 51 (Kimble Glass) para fabricar micropipetas con una resistencia de 2- 4 M $\Omega$ . Los registros se realizaron 24 horas después del cultivo de células insulares. Se restaron los transitorios capacitivos de la pipeta de registro y se integró el área del transitorio capacitivo de la membrana, lo cual nos proporcionó la medida de carga que es necesaria para crear una diferencia de potencial a través de la membrana. Se seleccionaron como células  $\beta$  únicamente a aquellas células cuyas capacitancias estuvieron en un rango de 5-10 pF.

#### Soluciones de registro

Para obtener los registros de las corrientes de K<sup>+</sup> en las células  $\beta$ , se utilizaron las siguientes soluciones:

- Solución externa (mM): 140 NaCl, 4 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 10 HEPES y 10 glucosa. Se ajustó a un pH: 7.4 con NaOH.
- Solución interna (mM): 140 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1 EGTA, 10 HEPES y 5 MgATP. Se ajustó a un pH de 7.2, con KOH.

Para la construcción de las gráficas de la dependencia de la corriente en el voltaje (IV), se registraron las corrientes totales aplicando pulsos cuadrados despolarizantes desde -100 a +80 mV, con incrementos de 10 mV a partir de un potencial de mantenimiento de -80 mV y con 100 ms de duración.

Para estudiar la dependencia de la activación en el voltaje, se aplicó un protocolo de colas de corriente convencional, como se explica a continuación. A partir de un potencial de mantenimiento de -80 mV, se aplicaron prepulsos despolarizantes de 100 ms de duración desde -60 a 60 mV, con incrementos de 10 mV, inmediatamente

después un pulso de prueba de 20 ms a -40 mV. La conductancia se obtuvo a partir de la Ley de Ohm con la ecuación:

$$G_k = I_k / (V_m - E_k)$$

Donde  $I_k$  es la corriente de potasio medida en la cola de corriente,  $V_m$  es el potencial del pulso al que se obtuvo  $I_k$  (-40 mV) y  $E_k$  el potencial de inversión el cual fue calculado con la ecuación de Nernst:  $E_k = \frac{RT}{ZF} \ln \left[ \frac{[K^+]_e}{[K^+]_i} \right]$  donde R es la constante universal de los gases, T es la temperatura, Z es la valencia del ion  $K^+$ , F es la constante de Faraday y  $[K^+]_e$  es la concentración de  $K^+$  intracelular (i) y extracelular (e).

Posteriormente, se construyeron curvas de conductancia normalizada en función del voltaje y se ajustaron con la ecuación de Boltzmann:

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

Donde  $G/G_{max}$  es la relación entre la conductancia (G) y la conductancia máxima ( $G_{max}$ ), V corresponde al potencial de membrana al que fue medida la conductancia,  $V_{1/2}$  es el potencial al cual el 50 % de los canales están activos y corresponde a la mitad de  $G/G_{max}$ , y k representa el factor de la pendiente.

Para estudiar la inactivación de las corrientes de potasio en estado estacionario se utilizó un protocolo de doble pulso, el cual consiste en aplicar un prepulso largo que va desde un potencial de -120 mV hasta +30 mV y con una duración de 8 s, seguido de un pulso de prueba de 100 ms a +40 mV.

Los datos de la inactivación de estado estacionario se ajustaron con la ecuación de Boltzmann:

$$I/I_{max} = (1 / (1 + \exp[-(V - V_{1/2})/k]))$$

Donde  $I/I_{max}$  es la relación entre la amplitud de corriente (I) y la amplitud de corriente máxima ( $I_{max}$ ),  $V_{1/2}$  es el potencial en el cual  $I/I_{max}$  es la mitad de su máximo, y k representa el factor de la pendiente.

## Inmunofluorescencia

Los páncreas de los animales de ambos grupos se fijaron en paraformaldehído al 4 %, posteriormente se deshidrataron a través de un gradiente creciente de alcoholes para finalmente incluirlos en parafina; después se realizaron cortes de 5 micras y se colocaron en portaobjetos pretratados con gelatina. Posteriormente, los cortes histológicos se desparafinaron en un horno a 60 °C durante 15 minutos y después se lavaron con agua corriente.

El tejido se rehidrató colocándolo en alcoholes en el siguiente orden:

- Xilol 100 % → 10 minutos
- Alcohol absoluto → 4 minutos
- Alcohol 96 % → 5 minutos
- Alcohol 70 % → 5 minutos
- Alcohol 50 % → 5 minutos
- Agua destilada → 15 minutos

Al terminar de hidratar, las láminas con el tejido se lavaron tres veces con solución amortiguadora de fosfatos (PBS 1X, 0.1 M) durante cinco minutos. Se agregó solución perforante bloqueadora durante 1 hora (suero normal de cabra (SNC) 2 %, tritón 0,3 %) y se lavó 3 veces con PBS 1X.

Para identificar a los canales presentes en los islotes pancreáticos, se agregaron anticuerpos primarios para Kv 2.1 y Kv 2.2, ambos de conejo en dilución 1:100. En la misma lámina, cada uno de los anticuerpos de los canales se agregó junto con el anticuerpo de insulina (cobayo) a una dilución de 1:2000 y se incubaron a 4 °C durante toda la noche en cámara húmeda.

Luego, se lavó la lámina con PBS 1X (tres veces) y se agregaron los anticuerpos secundarios, Alexa 647 anti-conejo y fluoresceína (FITC) anti-cobayo en dilución 1:100, en PBS 1X. Se colocó primero el Alexa 647 durante una hora a temperatura ambiente. Después se lavó el fluoroforo 3 veces con PBS 1X y posteriormente se agregó la fluoresceína durante una hora en oscuridad.

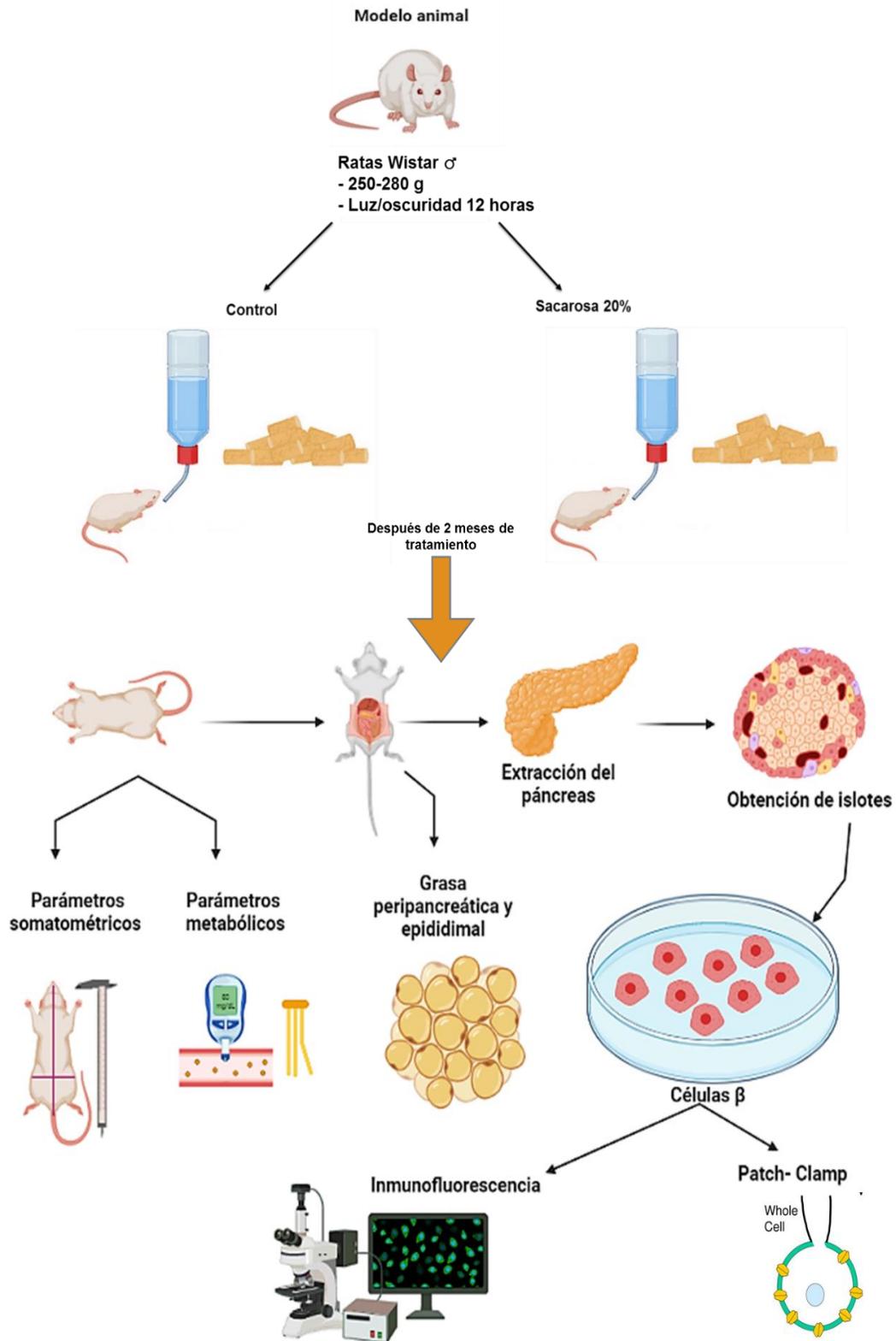
Después la lámina se lavó nuevamente con PBS 1X (tres veces) y en oscuridad se agregó DAPI (4,6-diamino-fenilindole) 1mg/ml por 15 minutos, para teñir los núcleos.

Para finalizar se realizó un último lavado con PBS 1X. Se le agregó el medio de montaje DAKO y enseguida se colocó el cubreobjetos. Por último, se dejó secando en oscuridad por aproximadamente una semana para su posterior revisión en el microscopio.

Para medir y analizar la expresión de los canales Kv2 en los islotes pancreáticos, se tomaron fotografías utilizando una cámara conectada a un microscopio de epifluorescencia Olympus TH4-100. Los islotes se identificaron usando la marca para insulina, después se cambió el filtro para poder ver la marca para el canal de potasio y se seleccionaron campos con islotes pancreáticos. Se tomaron fotografías usando un objetivo 20X para las marcas de núcleos, insulina y canales. Se utilizó el software MacBiophotonics ImageJ para el procesamiento y cuantificación de la fluorescencia. Para calcular la intensidad media de fluorescencia de la marca para los canales Kv2.1 y Kv2.2, se hicieron 5 mediciones usando una ROI con un área determinada, misma que se usó para cada islote. También se usó esa misma ROI o la misma área, para medir la intensidad de fluorescencia media en 5 regiones distintas donde no había la marca específica para canal e insulina y los promedios de estas mediciones se restaron a las mediciones de intensidad de fluorescencia del canal.

### Análisis estadístico

Todos los datos se reportaron como la media  $\pm$  error estándar de la media (EE), a menos que se indique lo contrario. Los datos mostraron distribución normal y las pruebas t-student y ANOVA se realizaron con el paquete estadístico GraphPad Prism v.6.01 (GraphPad Software, Inc.) en donde se realizó una post-prueba de Bonferroni. Valores de  $p < 0.05$  se consideraron significativos.



**Figura 11. Representación esquemática de la metodología.** Resumen esquemático del procedimiento experimental empleado.

## Resultados

### Consumo calórico

Durante las 8 semanas de tratamiento con sacarosa al 20 % se cuantificó el consumo de agua (en ml/caja) y alimento sólido (en g/caja), a partir de esto se calculó el consumo calórico para cada rata por día en cada grupo experimental, con la finalidad de observar si el grupo tratado consumió más calorías provenientes de los carbohidratos que el grupo control.

En la tabla 4 y 5 se muestran los resultados que se obtuvieron de estos experimentos y se observa que los animales tratados consumieron menos alimento ( $27.37 \pm 0.33$  g/día/rata vs  $13.46 \pm 0.29$  g/día/rata) y más agua (con sacarosa 20 %) ( $55.89 \pm 0.80$  ml/día/rata vs  $70.45 \pm 1.73$  ml/día/rata) en comparación con los animales control. Además, el grupo tratado consumió más calorías provenientes de los carbohidratos, y el consumo calórico proveniente de lípidos y proteínas fue mayor en el grupo control. A pesar de haber consumido estos nutrientes en diferentes proporciones, la cantidad total de calorías por día consumidas por los animales de ambos grupos no fue estadísticamente diferente.

Posteriormente se analizó la contribución calórica de cada nutriente de acuerdo con el consumo de cada grupo. Los animales expuestos a dietas con la sacarosa al 20 % ( $89.5 \pm 1.58$  Kcal/día/rata) consumieron más carbohidratos en comparación con los animales control ( $64.9 \pm 0.95$  Kcal/día/rata) (Tabla 4 y 5), este exceso de calorías se compensó disminuyendo el consumo de proteínas ( $32.1 \pm 0.47$  Kcal/día/rata vs  $15.8 \pm 0.82$  Kcal/día/rata) y lípidos ( $15 \pm 0.22$  Kcal/día/rata vs  $7.4 \pm 0.38$  Kcal/día/rata) en comparación con el control, de tal forma que al final el consumo calórico total fue semejante entre el grupo control ( $112.0$  Kcal/día/rata) y el grupo tratado con sacarosa al 20 % ( $112.7$  Kcal/día/rata).

	Control	Sacarosa 20 %
<b>Alimento (g/día/rata)</b>	27.4 ± 0.33	13.5 ± 0.29*
<b>Agua (ml/día/rata)</b>	55.9 ± 0.80	70.5 ± 1.73*

**Tabla 4. Consumo de agua y alimento.** Control (n= 4), sacarosa 20% (n= 4).

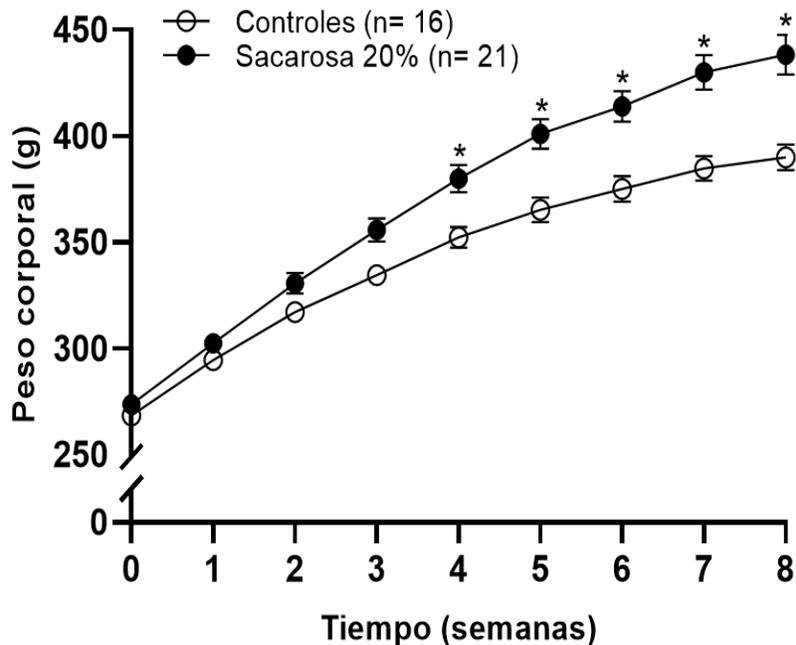
Nutrientes	Control (Kcal/día/rata)	Sacarosa 20% (Kcal/día/rata)
Carbohidratos	64.9 ± 0.95 (58 %)	89.5 ± 1.58 (79 %)*
Proteínas	32.1 ± 0.47 (29 %)	15.8 ± 0.82 (14 %)*
Lípidos	15 ± 0.22 (13 %)	7.4 ± 0.38 (7 %)*
<b>Total</b>	<b>112.0</b>	<b>112.7</b>

**Tabla 5. Cuantificación del consumo calórico en kilocalorías por día por rata.** Control (n = 4), sacarosa 20% (n = 4).

### Caracterización del modelo

Con la finalidad de estudiar si el tratamiento con sacarosa al 20 % tenía un efecto sobre la ganancia de peso, se cuantificó el peso corporal de los animales cada semana durante el tratamiento. Después de 8 semanas, el grupo tratado con la solución de sacarosa incrementó considerablemente su peso corporal (438.33 ± 9.22 g) en comparación con el grupo control (390.06 ± 5.98 g), esta ganancia fue significativa a partir de la cuarta semana (352.25 ± 4.86 g vs 379.95 ± 6.31 g) y aumento gradualmente hasta a semana 8 (Figura 13). Lo que nos indicó que el tratamiento con sacarosa al 20 % tiene efecto sobre la ganancia de peso corporal, tal y como se observó en trabajos anteriores de nuestro laboratorio (Ruiz, 2018; Cruz-cruz et al., 2022).

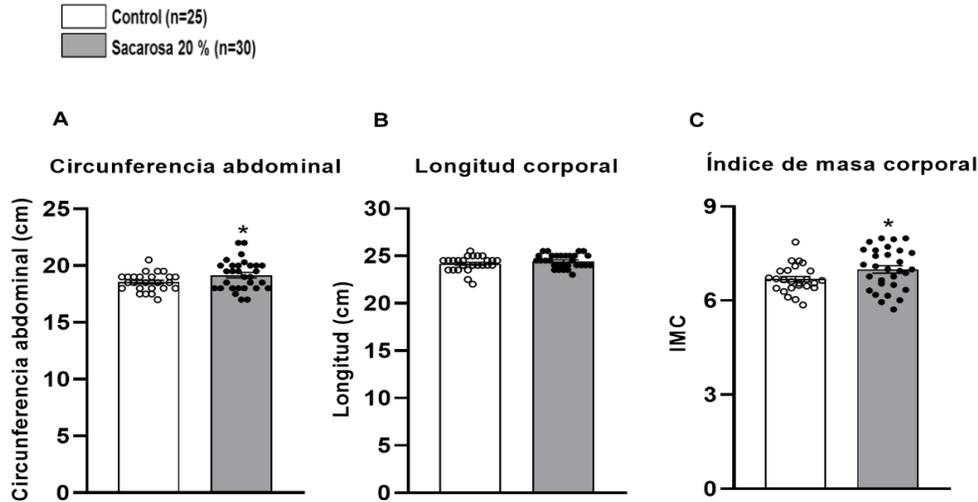
La obesidad central, es uno de los signos que forman parte del SM. Para determinar si esta se presentó bajo nuestras condiciones experimentales, se realizaron mediciones de circunferencia abdominal y se calculó el índice de masa corporal (IMC), tomando en cuenta el peso corporal y la longitud del animal al final del tratamiento.



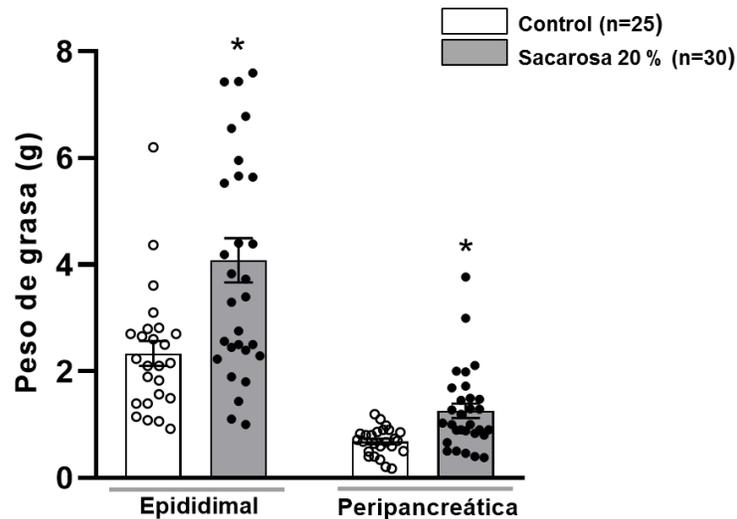
**Figura 13. Ganancia de peso corporal durante las 8 semanas de tratamiento.** Peso corporal obtenido después de 8 semanas de tratamiento en el grupo control ( $390.06 \pm 5.98$  g) ( $n= 16$ ) y el grupo tratado con sacarosa 20% ( $n=21$ ) ( $438.33 \pm 9.22$  g). Los símbolos representan media  $\pm$  E.E. \* $p < 0.05$  vs control.

El grupo tratado con sacarosa al 20 % mostró un aumento de la circunferencia abdominal ( $18.56 \pm 0.15$  cm vs  $19.16 \pm 0.24$  cm) (Figura 14 A) e IMC ( $6.68 \pm 0.08$  vs  $6.99 \pm 0.12$ ) (Figura 14 C). Mientras que la longitud corporal, no tuvo diferencias ( $24.16 \pm 0.15$  cm vs  $24.45 \pm 0.12$  cm) (Figura 14 B).

La mayor ganancia de peso se observada en el grupo tratado, se asoció a un incremento en la cantidad de tejido adiposo peripancreático ( $0.68 \pm 0.05$  g vs  $1.26 \pm 0.13$  g) y epididimal ( $2.33 \pm 0.23$  g vs  $4.08 \pm 0.41$  g) (Figura 15); lo que indicó que el tratamiento con sacarosa al 20 % conduce al desarrollo de obesidad central.



**Figura 14. El tratamiento con sacarosa 20 % conduce al desarrollo de obesidad central.** (A) Circunferencia abdominal ( $18.56 \pm 0.15$  cm vs  $19.16 \pm 0.24$  cm); (B) Longitud corporal; (C) IMC calculado a partir del peso corporal al final del tratamiento ( $6.68 \pm 0.08$  vs  $6.99 \pm 0.12$ ) y la longitud corporal ( $24.16 \pm 0.15$  cm vs  $24.45 \pm 0.12$  cm). Control n=25, sacarosa 20 % n=30. Las barras representan media  $\pm$  E.E. \* $p < 0.05$  vs control.

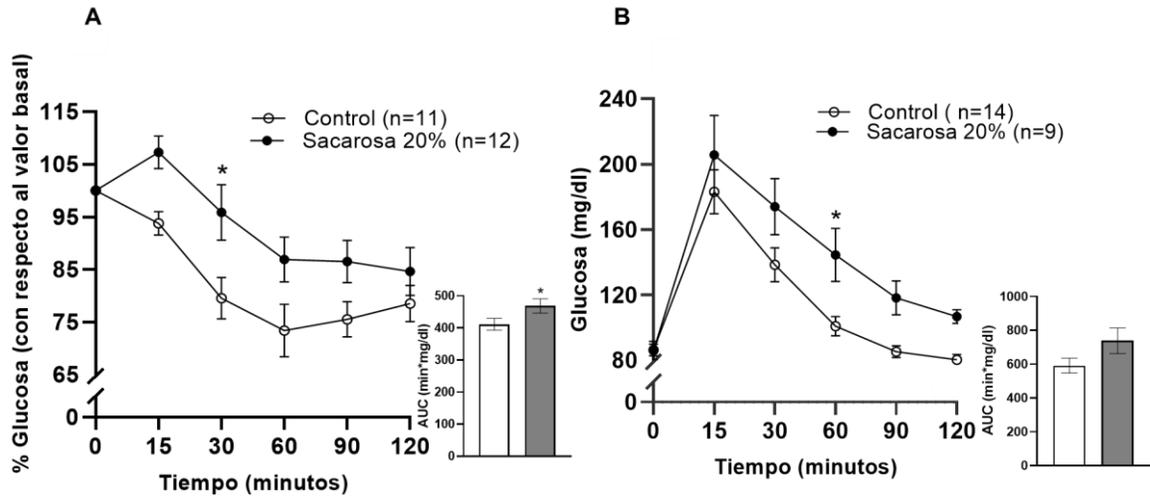


**Figura 15. La grasa peripancreática y epididimal aumenta después del tratamiento con sacarosa 20%.** Peso de la grasa epididimal (izquierda) ( $2.33 \pm 0.23$  g vs  $4.08 \pm 0.41$  g) y peripancreática ( $0.68 \pm 0.05$  g vs  $1.26 \pm 0.13$  g) (derecha) después de 8 semanas de tratamiento con sacarosa al 20%. Control n=25, sacarosa 20% n=30. Las barras representan media  $\pm$  E.E. \* $p < 0.05$  vs control.

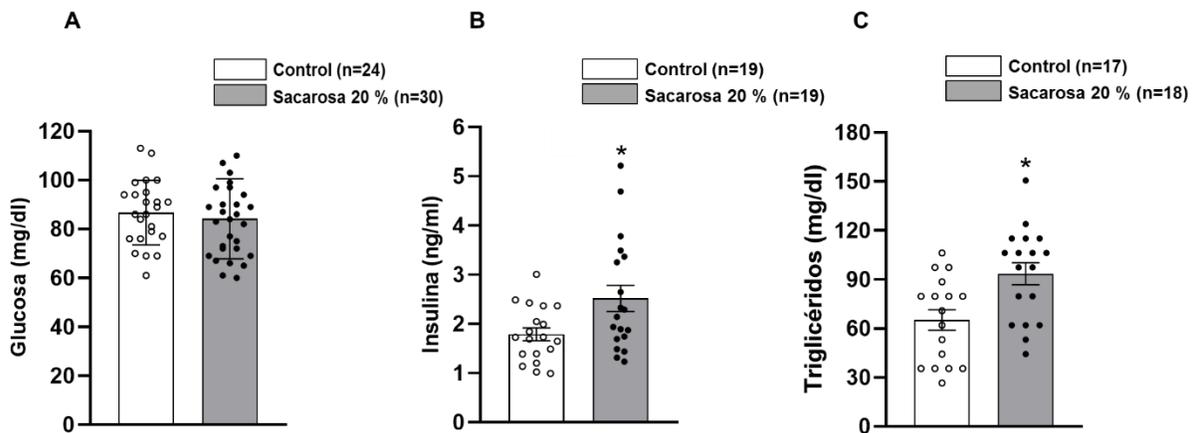
La resistencia a la insulina se evaluó mediante curvas de sensibilidad a la insulina (Figura 16 A) y de tolerancia a la glucosa (Figura 16 B). En la curva de sensibilidad a la insulina se observó que el grupo tratado mostró mayores porcentajes de glucosa, siendo significativas al minuto 30 ( $79.55 \pm 3.91$  % vs  $95.86 \pm 5.29$  %) (Figura 16 A). El área bajo la curva para los animales tratados con sacarosa al 20 % fue mayor ( $468.9 \pm 22.3$  min\*mg/dl), estos resultados indicaron que los animales tratados tienen resistencia a la insulina en comparación con el grupo control ( $411.5 \pm 18.5$  min\*mg/dl).

En la curva de tolerancia a la glucosa el grupo tratado con sacarosa mostró concentraciones de glucosa mayores después de la administración de la glucosa ( $144.55 \pm 5.87$  mg/dl), siendo el minuto 60 estadísticamente distinto en comparación con el grupo control ( $100.90 \pm 16.29$  mg/dl), aunque no se observó diferencia en el área bajo la curva ( $591.3 \pm 43.8$  vs  $738.9 \pm 75.9$  min\*mg/dl) (Figura 16 B). Aun así, ambas curvas indicaron resistencia a la insulina debido a que las concentraciones de glucosa son mayores en el grupo tratado

Los parámetros metabólicos analizados mostraron que no hay diferencias en las concentraciones de glucosa en ayuno ( $86.75 \pm 2.69$  mg/dl vs  $84.20 \pm 3.03$  mg/dl) (Figura 17 A), al igual que en los niveles de insulina ( $1.78 \pm 0.12$  ng/ml vs  $2.51 \pm 0.26$  ng/ml) (Figura 17 B), además, se observó aumento en los niveles de triglicéridos plasmáticos ( $65.14 \pm 6.30$  mg/dl vs  $93.52 \pm 6.68$  mg/dl) (Figura 17 C).



**Figura 16. El tratamiento con sacarosa al 20 % durante 8 semanas produce resistencia a la insulina.** (A) Prueba de sensibilidad a la insulina ( $79.55 \pm 3.91$  % vs  $95.86 \pm 5.29$  %) (Control n=11, sacarosa 20 % n=12); (B) prueba de tolerancia a la glucosa ( $100.90 \pm 16.29$  mg/dl vs  $144.55 \pm 5.87$  mg/dl) (control n=14, sacarosa 20 % n=9) en animales controles y tratados. Las barras en cada curva muestran el AUC (área bajo la curva) para controles (blanco) y sacarosa (grises). Los puntos representan media  $\pm$  E.E. \* $p < 0.05$  vs control.



**Figura 17. El tratamiento con sacarosa 20 % incrementa los niveles de insulina y triglicéridos.** (A) Niveles de la glucosa en sangre en ayuno ( $86.75 \pm 2.69$  mg/dl vs  $84.20 \pm 3.03$  mg/dl) (control n=24, sacarosa 20 % n=30); (B) Niveles plasmáticos de insulina ( $1.78 \pm 0.12$  ng/ml vs  $2.51 \pm 0.26$  ng/ml) (control n= 19, sacarosa 20 % n=19); (C) Niveles plasmática de triglicéridos ( $65.14 \pm 6.30$  mg/dl vs  $93.52 \pm 6.68$  mg/dl) (control n= 17, sacarosa 20 % n=18). Las barras representan media  $\pm$  E.E. \* $p < 0.05$  vs control.

## Caracterización electrofisiológica

Con el objetivo de analizar las corrientes acarreadas por los canales de potasio Kv2, se aplicaron pulsos despolarizantes de -60 a 70 mV desde un potencial de mantenimiento de -80 mV (Figura 18 A, 19 A y 20 A) utilizando la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana (Patch-Clamp) en configuración de célula completa (Whole-cell).

La figura 18 B muestra el comportamiento de las familias de corrientes de K<sup>+</sup> representativas registradas en las células β pancreáticas de animales controles (negro) y tratados con sacarosa al 20 % (rojo). La densidad de corriente saliente de K<sup>+</sup> acarreada por los canales Kv2 no muestra diferencias significativas después del tratamiento con sacarosa 20 % ( $216.46 \pm 15.93$  pA/pF vs  $186.01 \pm 15.26$  pA/pF) (Figura 18 C y D).

Con la finalidad de distinguir la porción de corriente que era acarreada a través de los canales Kv2.1, se utilizó guanxitoxina-1E (GxTx1-E) (1 μM), una toxina que es específica para estos canales. En la figura 19 B se muestra el efecto inhibitorio de la toxina (rojo) sobre la familia de corrientes de los canales Kv2 en células β pancreáticas de animales del grupo control (negro).

La densidad de corriente de K<sup>+</sup> disminuyó, en promedio, un 42.54 % después de que las células del grupo control ( $216.46 \pm 15.93$  pA/pF) se expusieron a GxTx-1E ( $124.38 \pm 20.54$  pA/pF) (Figura 19 C), esta disminución representa la proporción de corriente de K<sup>+</sup> que es acarreada por los canales Kv2.1 (Figura 19 D). Para confirmar que efectivamente se trataba de corrientes de K<sup>+</sup> acarreadas por canales Kv se agregó TEA (20 mM), un bloqueador clásico de los canales Kv, se apreció que la corriente disminuyó 93.05 % ( $15.02 \pm 10.92$  pA/pF).

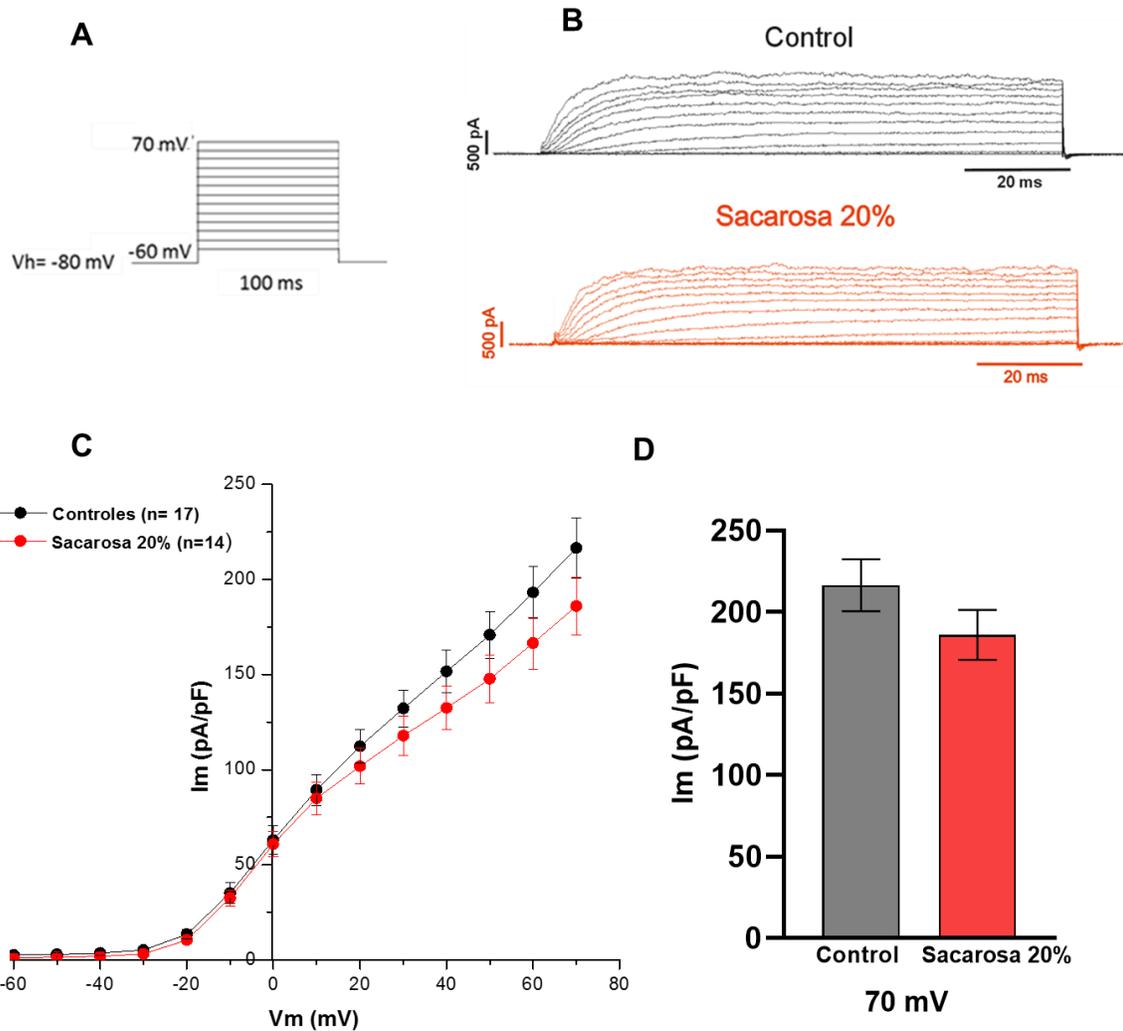
Las familias de corrientes de K<sup>+</sup>, de los canales Kv2 de células β tratadas (Figura 20 B), se redujeron después de que se agregó GxTx-1E (1 μM) y aún más después del TEA (Figura 20 C). La densidad de corriente mostró decrementos de un 47.19 % en células β del grupo tratado ( $186.01 \pm 15.26$  pA/pF) después de la exposición

a GxTx-1E ( $105.13 \pm 10.79$  pA/pF) y (Figura 20 D), este porcentaje representa la proporción de corriente acarreada por Kv2.1. Al añadir TEA (20 mM) la corriente de potasio se redujo 79.74 % ( $37.68 \pm 5.28$  pA/pF).

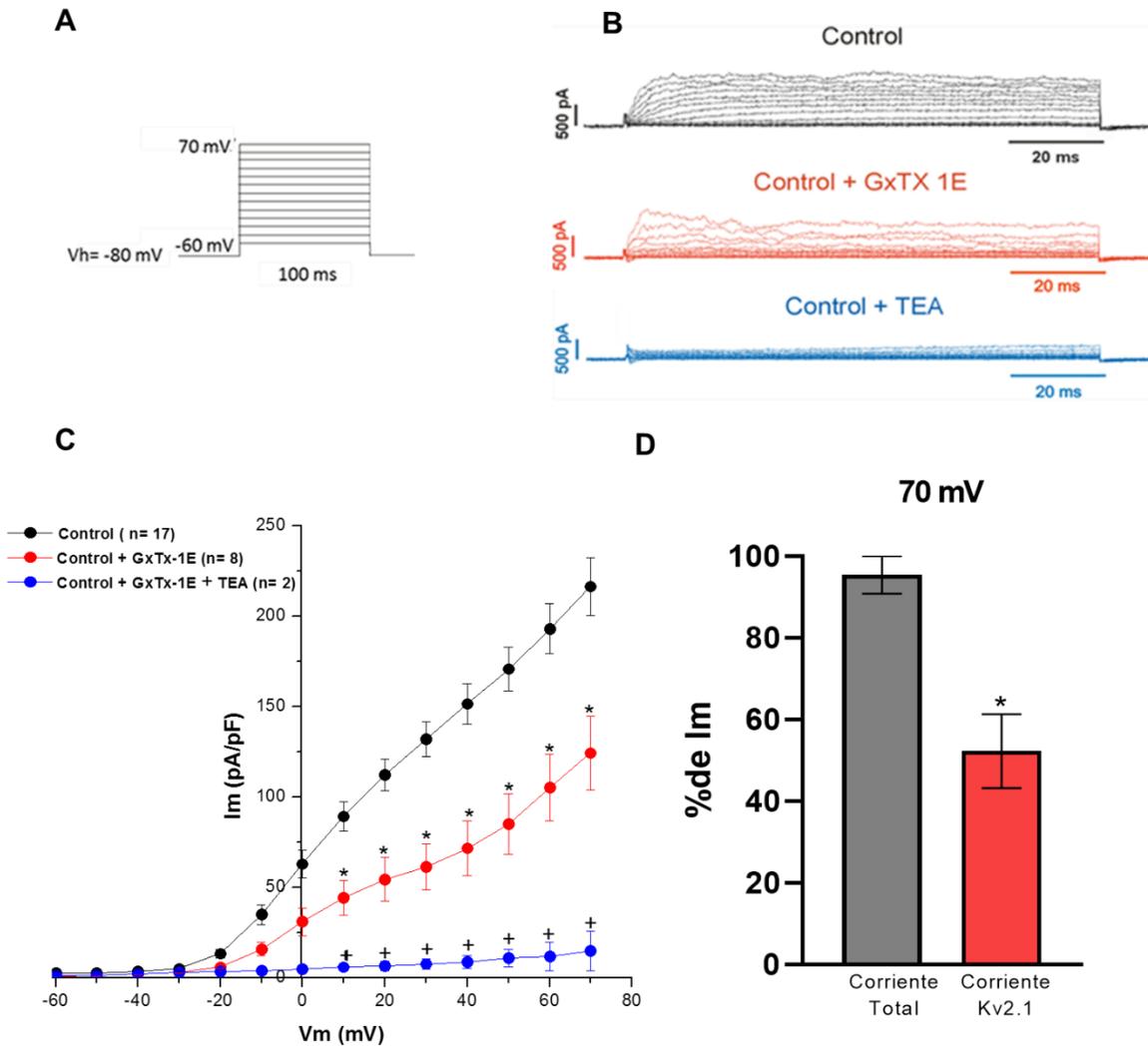
Continuando con la caracterización biofísica de los canales de Kv2, se analizó la dependencia de voltaje de la activación e inactivación en estado estacionario, se graficaron los valores para las conductancias normalizadas y se ajustaron con la ecuación de Boltzmann. Estos ajustes nos permitieron obtener los valores de  $V_{1/2}$  ( $V_m$  al que el 50 % de los canales están activos o inactivos) y  $k$  (pendiente).

Los protocolos para medir activación e inactivación se aplicaron como se describe en los métodos; sin embargo, el ajuste en la activación en estado estable se hizo de -60 a 60 mV, mientras que en la inactivación se hizo de -80 mV a 20mV.

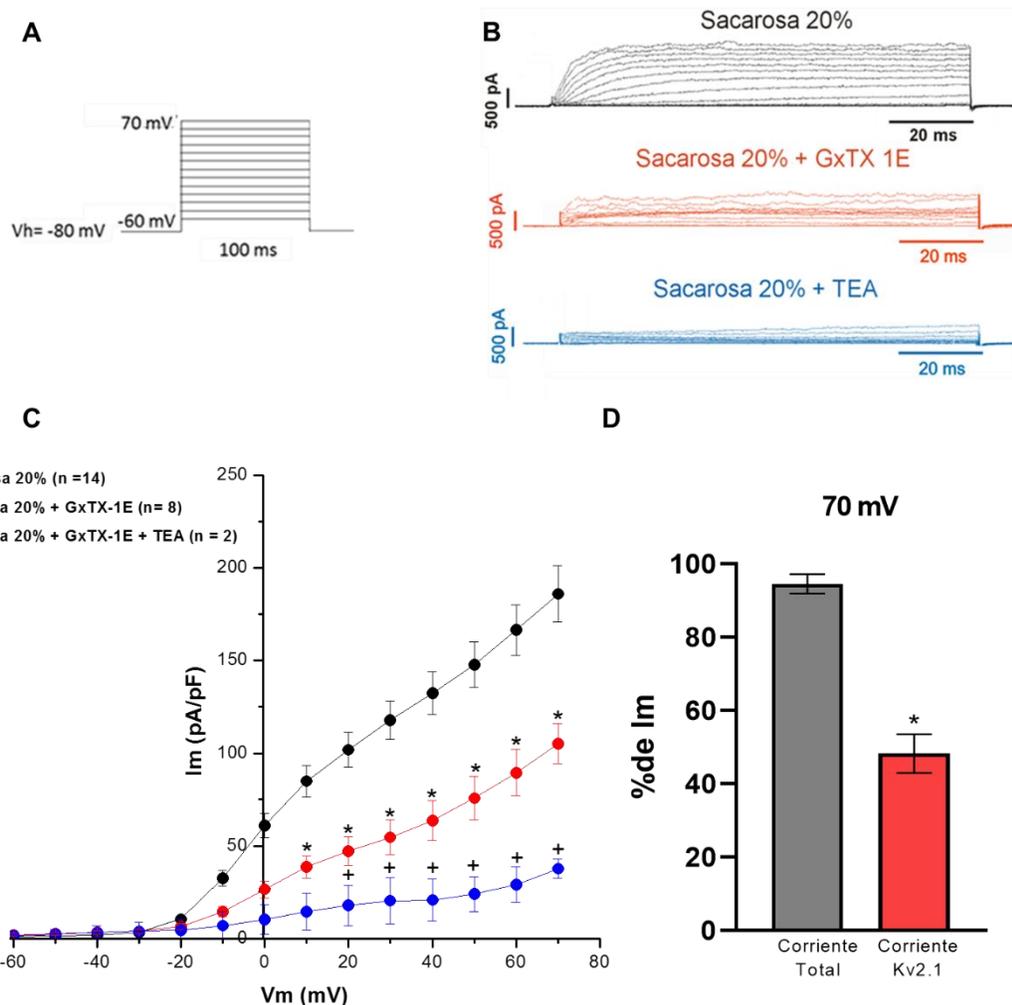
Con relación en la activación (Figura 21 A) los valores de  $V_{1/2}$  ( $-11.97 \pm 0.54$  mV vs  $-12.48 \pm 0.85$  mV) y los de  $k$  ( $6.06 \pm 0.48$  vs  $6.21 \pm 0.77$ ) no mostraron diferencias. Mientras que en la inactivación en estado estable no se observaron cambios en  $V_{1/2}$  ( $-24.32 \pm 0.96$  mV vs  $-24.93 \pm 1.25$  mV) y en  $k$  ( $10.13 \pm 0.80$  vs  $11.31 \pm 0.99$ ) en ambas condiciones (Figura 21 B).



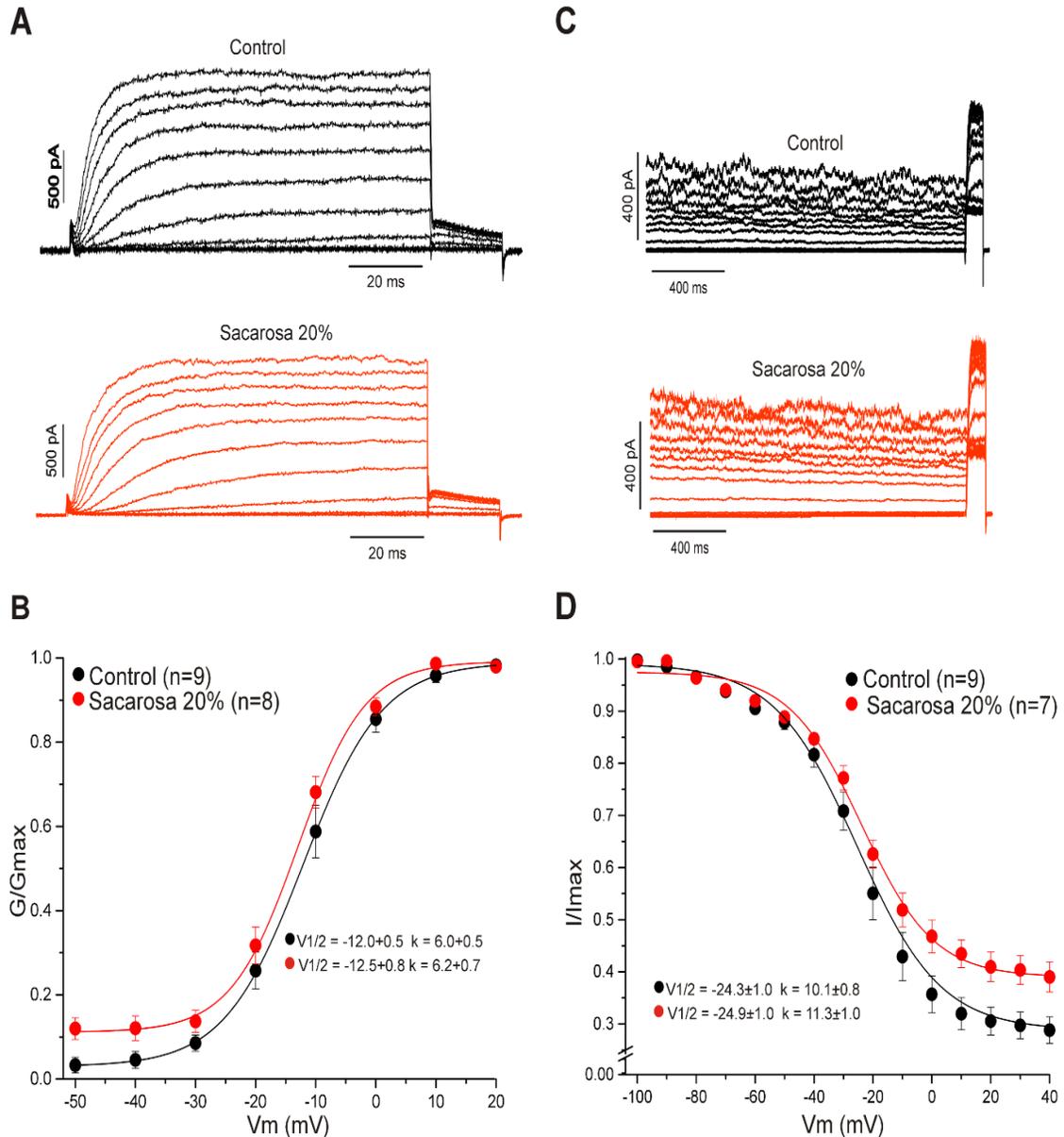
**Figura 18.** La densidad de corriente no cambia después del tratamiento con sacarosa al 20 %. (A) Protocolo de pulsos cuadrados; (B) Familias de corrientes de  $K^+$   $K_v$  de células  $\beta$  controles (negro) y tratadas (rojo); (C) Densidad de la corriente de  $K^+$  en función del voltaje en células  $\beta$  pancreáticas control ( $216.46 \pm 15.93$  pA/pF) ( $n=17$ ) y tratadas con sacarosa al 20 % ( $186.01 \pm 15.26$  pA/pF) ( $n=14$ ); (D) Densidad de corriente a +70 mV ( $216.46 \pm 15.93$  pA/pF vs  $186.01 \pm 15.26$  pA/pF). Las barras y símbolos representan media  $\pm$  E.E. \* $p < 0.05$  vs control.



**Figura 19. Contribución de los canales Kv2.1 a la corriente total de K<sup>+</sup> en células  $\beta$  control.** (A) Protocolo de pulsos cuadrados; (B) Familias de corrientes de K<sup>+</sup> Kv en presencia de GxTx-1E (1  $\mu$ M) y GxTx-1E más TEA (20 mM) en células  $\beta$  controles; (C) Densidad de corriente de canales Kv de células  $\beta$  controles ( $216.46 \pm 15.93$  pA/pF)(n=17), en presencia de GxTx-1E ( $124.38 \pm 20.54$  pA/pF) (n=8) y GxTx-1E más TEA ( $15.02 \pm 10.92$  pA/pF) (n=2); (D) Porcentaje de corriente acarreada por los canales Kv2.1 a 70 mV. Las barras y símbolos representan media  $\pm$  E.E. \*p<0.05 vs control, +p<0.05 vs control + GXTx-1E.



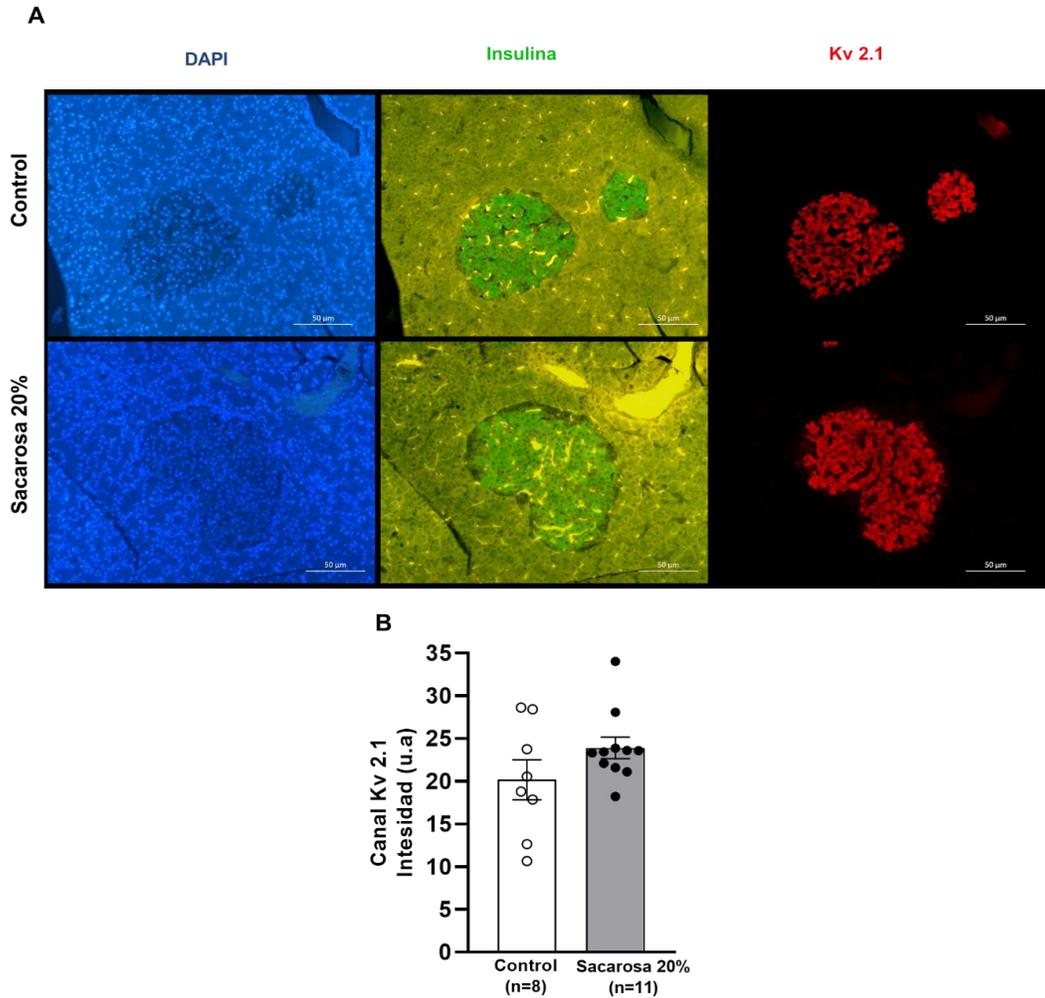
**Figura 20. Contribución de los canales *Kv2.1* a la corriente total de  $K^+$  en células  $\beta$  tratadas.** (A) Protocolo de pulsos cuadrado; (B) Familias de corrientes de  $K^+$  *Kv* en presencia de GxTx-1E (1  $\mu$ M) y GxTx-1E + TEA (20 mM); (C) Densidad de corriente de canales *Kv* de células  $\beta$  tratadas ( $186.01 \pm 15.26$  pA/pF) (n=14), en presencia de GxTx-1E ( $105.13 \pm 10.79$  pA/pF) (n=8) y GxTx-1E + TEA ( $37.68 \pm 5.28$  pA/pF) (n=2); (D) Porcentaje de corriente acarreada por los canales *Kv2.1* a 70 mV. Los símbolos y barras representan media  $\pm$  E.E. \* $p < 0.05$  vs control, + $p < 0.05$  vs Sacarosa + GxTx-1E.



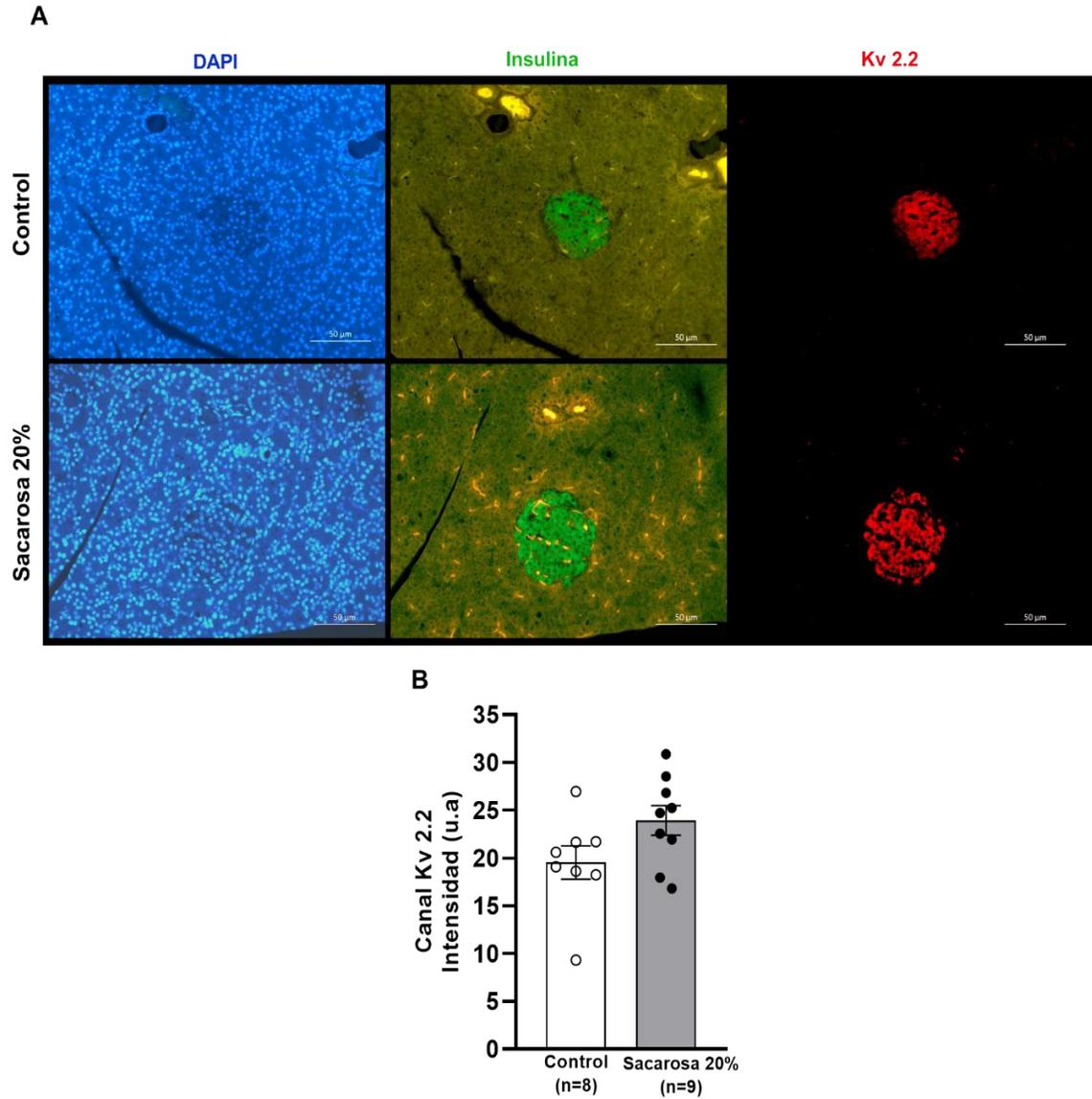
**Figura 21. La activación e inactivación en estado estable no se modifican con el tratamiento con la sacarosa al 20 %.** (A) Familias de corriente representativas obtenidas con el protocolo de doble pulso, la cola de corriente fue graficada en B; (B) Dependencia de voltaje de la activación en estado estable en condiciones control y tratamiento, la líneas representan el ajuste a la ecuación de Boltzmann con valores de  $V_{1/2}$  ( $-11.97 \pm 0.54$  mV vs  $-12.48 \pm 0.85$  mV) (control  $n=9$ , sacarosa 20 %  $n=8$ ) y  $k$  ( $6.06 \pm 0.48$  vs  $6.21 \pm 0.77$ ) (control  $n=9$ , sacarosa 20 %  $n=8$ ) (abajo); (C) Registros representativos de la parte final del prepulso y pulso de prueba en el protocolo de inactivación; (D) Dependencia de voltaje de la inactivación en estado estable en condiciones control y tratamiento, con valores de  $V_{1/2}$  ( $-24.32 \pm 0.96$  mV vs  $-24.93 \pm 1.25$  mV) (control  $n=9$ , sacarosa 20 %  $n=7$ ) y  $k$  ( $10.13 \pm 0.80$  vs  $11.31 \pm 0.99$ ) (control  $n=9$ , sacarosa 20 %  $n=7$ ) para cada condición (abajo). Los símbolos representan media  $\pm$  E.E.

## Expresión de canales Kv2

Con la finalidad de determinar si el comportamiento de las corrientes de K<sup>+</sup> acarreadas por los canales Kv2 se correlacionaba con la abundancia de la proteína, se analizó la expresión de los canales Kv2.1 y Kv2.2 mediante inmunofluorescencia, en donde la intensidad de fluorescencia de cada islote se midió en 5 regiones distintas y luego fue promediada y se restó el ruido de fondo. Después de 8 semanas del tratamiento con sacarosa al 20 %, no se observaron cambios significativos en la intensidad de fluorescencia de Kv2.1 ( $20.16 \pm 2.34$  u.a vs  $23.90 \pm 1.24$  u.a) (Figura 22) y Kv2.2 ( $19.52 \pm 1.75$  u.a vs  $23.94 \pm 1.54$  u.a) (Figura 23) en los islotes pancreáticos de ambos grupos. El tratamiento con sacarosa no afectó la expresión de los canales Kv2.1 y Kv2.2, incluso ni densidad de corriente se vio afectada. Podríamos pensar que el hecho de que la expresión de los canales Kv2.1 y Kv2.2 no se haya afectado, podría explicar porque la densidad de corriente no tuvo alteraciones o que simplemente el tratamiento no tuvo efecto alguno sobre estas.



**Figura 22. La expresión del canal Kv2.1 no cambia después del tratamiento con sacarosa 20 %.** A) Micrografías de fluorescencia representativas de la expresión de insulina y el canal Kv2.1 en islotes pancreáticos, DAPI (azul), Insulina (verde), canal Kv2.1 (rojo); B) Intensidad de fluorescencia medida a partir de las micrografías mostradas en A (control (n=8)  $20.16 \pm 2.34$  u.a vs sacarosa 20 % (n=11)  $23.90 \pm 1.24$  u.a) . Barra de calibración 50  $\mu$ m. Las barras representan media  $\pm$  E.E. Los símbolos en las barras representan el número de islotes medidos. u.a: unidades arbitrarias.



**Figura 23. La expresión del canal Kv 2.2 no cambia después del tratamiento con sacarosa 20 %.** A) Micrografías de fluorescencia representativas de la expresión de insulina y el canal Kv 2.2, DAPI (azul), Insulina (verde), canal Kv2.2 (rojo); B) Intensidad de fluorescencia medida a partir de las micrografías mostradas en A (control (n=8)  $19.52 \pm 1.75$  u.a vs sacarosa 20 % (n=9)  $23.94 \pm 1.54$  u.a). Barra de calibración 50  $\mu$ m. Las barras representan media  $\pm$  E.E. Los símbolos en las barras representan el número de islotes medidos. u.a: unidades arbitrarias.

## Discusión

### Desarrollo del síndrome metabólico

El consumo de bebidas azucaradas (Malik et al., 2006, 2010) y la falta de actividad física contribuyen al desarrollo del SM, el cual es un problema de salud pública a nivel mundial (Heiss et al., 2014). Trabajos anteriores han demostrado que existe una variabilidad en la dosis, la duración y la administración de dietas ricas en carbohidratos para inducir el SM en animales (Moreno-Fernández et al., 2018; Melo et al., 2019; Cruz et al., 2020). En nuestro laboratorio se empleó un tratamiento de sacarosa al 20 % en el agua de bebida durante 8 semanas. Después de este tiempo los animales desarrollan prácticamente todos los signos del SM, haciéndolo un buen modelo animal para estudiar la fisiopatología de este síndrome (Larqué et al., 2011).

El síndrome metabólico es una condición que aumenta el riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo 2. Las células  $\beta$  pancreáticas, transitan de un estado de hipersecreción de insulina en el SM, a un estado en el que se agotan y disminuyen su secreción de insulina, como ocurre, en la diabetes mellitus tipo 2. Los mecanismos que conducen al agotamiento no se conocen por completo. Por ello, entender los mecanismos que conllevan al desarrollo de hiperinsulinemia durante el síndrome metabólico es importante.

Se ha demostrado desde hace ya varios años, que el uso de dietas ricas en sacarosa en el agua de bebida induce SM en ratas y no así en ratones (Chen et al., 2011). Lo anterior se favorece por la adicción de las ratas al azúcar y el incremento en la ganancia de peso (Avena et al., 2008). En este trabajo evaluamos el consumo de agua y alimento en animales control y tratados con la sacarosa al 20 % confirmando lo observado en trabajos anteriores (Cruz-cruz et al., 2022). El mayor consumo de calórico del grupo tratado, relacionado con la adicción por el azúcar, se podría relacionar con la capacidad que tienen las ratas para regular su ingesta calórica, en condiciones *ad libitum* con una dieta alta en carbohidratos son capaces de regular su consumo y mantener el balance nutricional (Sclafani & Xenakis, 1984).

Trabajos anteriores en los que se administraron tratamientos de sacarosa 20% durante 8 semanas (Larqué et al., 2011; Cruz-Cruz et al., 2022), sacarosa al 30 % durante 20 semanas en ratas de 28 días de vida (El Hafidi et al., 2001; Aguilera et al., 2004); y en tratamientos combinados de sacarosa 30 % y fructuosa 10 % en ratas al momento del destete (21 días), han mostrado que la cantidad de calorías consumidas es mayor en los animales que recibieron el tratamiento en comparación con los grupos control (Arias-Chávez et al., 2022). Lo que concuerda con nuestras observaciones.

El aumento en la ingesta calórica influyó en el peso corporal de los animales con el tratamiento de sacarosa 20 %, que se relacionó con el aumento en el perímetro abdominal, IMC, y con el incremento de la grasa peripancreática y epididimal.

El incremento de estos parámetros se ha observado en estudios tanto a las 8 semanas (Larqué et al., 2011; Ruiz, 2018; Velasco et al., 2020; Cruz-cruz et al., 2022) como a las 24 semanas (Velasco et al., 2012) de tratamiento. Observaciones que incluso coinciden con dietas altas en carbohidratos/grasas a diferentes tiempos 3, 4, 16, 19 y 25 semanas (Melo et al., 2019; Moreno-Fernández et al., 2018); y con dietas con sacarosa al 40 % (20 semanas) (Cruz et al., 2020).

Las dietas altas en calorías y la obesidad contribuyen al cambio fenotípico del tejido adiposo blanco, caracterizado por la aparición de adipocitos disfuncionales junto con la infiltración de células inmunes (Kawai et al., 2021). En este estado se desarrolla un proceso inflamatorio de bajo grado en el que los adipocitos disfuncionales secretan citocinas proinflamatorias (IL1B, TNF $\alpha$  e IL6) y adipocinas de una manera anormal (leptina, adiponectina y resistina), alterando la función del tejido adiposo y de diferentes órganos (Hotamisligil, 2017). Las citocinas son importantes ya que regulan la inflamación y la angiogénesis, mientras que las adipocinas son importantes en la regulación de la señalización de la insulina, la absorción de glucosa, la oxidación de ácidos grasos etc. (Ahima & Lazar, 2008).

La infiltración de células inflamatorias en el tejido adiposo causa disfunción de los adipocitos y disfunción metabólica, como intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina; sin embargo, esta no es la única causa de inflamación y resistencia a la

insulina. Debido al gran almacenamiento de energía proveniente de la dieta y una gran acumulación de ácidos grasos libres, los adipocitos experimentan una expansión anormal (hipertrofia) lo que resulta en hipoxia y senescencia, las cuales inician y mantienen la condición inflamación crónica de bajo grado (Kawai et al., 2021) .

En esta condición los adipocitos presentan estrés del retículo endoplásmico (RE) y mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Lo que aunado a la secreción de citocinas proinflamatorias conduce a la alteración de las vías de señalización, lo que conduce a la resistencia a la insulina (Kawai et al., 2021).

La resistencia a la insulina conduce a la elevación de los niveles de glucosa en plasma lo que promueve una mayor demanda de insulina que conlleva a que las células  $\beta$  pancreáticas inicien una respuesta compensatoria secretando más insulina (hiperinsulinemia); además, la exposición aguda a carbohidratos eventualmente conduce a la disfunción de estas células y en última instancia a la diabetes tipo 2, a través de mecanismos relacionados con el estrés oxidativo, estrés de retículo, inflamación y senescencia (Nolan & Prentki, 2019; Kulkarni et al., 2023).

La resistencia a la insulina y la utilización deficiente de glucosa, también se observó después de la administración de tratamientos con sacarosa al 20 % durante 8 (Larqué et al., 2011; Cruz-Cruz et al., 2022) y 24 semanas (Velasco et al., 2012), así como con tratamientos de sacarosa al 40 % (Cruz et al., 2020).

Durante la hiperinsulinemia las vías del metabolismo de la glucosa muestran una regulación positiva. En ratas Wistar las células  $\beta$  pancreáticas desafiadas con carbohidratos aumentan la expresión de GLUT2, aumentando la actividad de la glucocinasa y promoviendo la secreción de insulina (C. Chen et al., 1994; Larqué et al., 2011). Mientras que en ratas Zucker se han mostrado aumentos de 3 a 10 veces en la secreción de insulina estimulada por glucosa debido a una mayor oxidación de glucosa (Y. Q. Liu et al., 2002).

La hiperinsulinemia e hipertrigliceridemia observadas coinciden con lo observado en trabajos anteriores con 8 semanas de tratamiento con sacarosa 20 % (Larqué et

al., 2011; Ruiz, 2018; Cruz-Cruz et al., 2022), incluso en otros trabajos con tratamientos de 20 semanas se observan valores mayores de insulina y triglicéridos ( Cruz et al., 2020; Arias-Chávez et al., 2022). Además, la hiperinsulinemia prolongada puede promover el desarrollo de resistencia a la insulina, debido a que puede afectar su detección en tejidos periféricos como el hígado y el músculo (Erion & Corkey, 2018; Nolan & Prentki, 2019)

A pesar de que las células  $\beta$  pueden generar una respuesta compensatoria a la resistencia a la insulina y la sobrenutrición, la síntesis de grandes cantidades de insulina, afecta la capacidad de plegamiento del retículo endoplásmico (RE), lo que lleva a la producción de proteínas mal plegadas que se acumulan en el RE provocando estrés y la activación de vías apoptóticas de las células  $\beta$  pancreáticas (Prentki & Nolan, 2006; Rabhi et al., 2014).

#### Los canales Kv2 en el síndrome metabólico

Como se mencionó anteriormente los canales de potasio Kv2.1 y Kv2.2 tienen una gran relevancia en el proceso de secreción de insulina estimulado por glucosa. Kv2.1 contribuye aproximadamente al 60 % de la corriente de  $K^+$  en las células  $\beta$  de rata (Macdonald et al., 2001). Además, ambos canales determinan la duración de los potenciales de acción (Jacobson et al., 2007), por lo que una disminución en su actividad podría conducir a un aumento en la duración de los potenciales de acción y una mayor secreción de insulina (Jacobson et al., 2007). En este trabajo analizamos los efectos del síndrome metabólico sobre la corriente de  $K^+$  Kv2 y su posible participación en el mecanismo de hiperinsulinemia. Nuestros resultados muestran, que la densidad de corriente de  $K^+$  Kv en células tratadas es ligeramente menor a potenciales positivos en comparación con las células control (Figura 14), sin llegar a ser estadísticamente distintas.

Se ha demostrado la expresión de varios miembros de la familia de canales de potasio activados por voltaje, tales como: Kv 1.4, 1.5, 1.6, 2.1, 2.2, 3.2, 6.2 y 9.3 (Roe et al., 1996; Macdonald et al., 2001; Yan et al., 2004), en células  $\beta$  pancreáticas de roedores, primates no humanos y humanos. Dentro de toda esta variedad de

miembros de la familia Kv, los canales de potasio Kv2.1 tienen un papel predominante en la repolarización y contribuyen entre un 60 a 80 % de la corriente rectificadora tardía (Jacobson et al., 2007; MacDonald et al., 2001). Así se ha mostrado que la HaTx (Tamarima et al., 2005) y GxTx-1E (Herrington et al., 2006; Li et al., 2013) inhibidores de Kv2.1 conducen a una disminución de la corriente de  $K^+$  de aproximadamente el 50 % en células  $\beta$  de ratón.

En este trabajo observamos una reducción similar de la corriente de potasio Kv en presencia de la toxina GxTx-1E, tanto en células control como las células tratadas con sacarosa, de aproximadamente un 55 % (Figuras 15 y 16), esto sugiere que la proporción de canales Kv2.1 no cambia con el síndrome metabólico. Si en células tratadas la corriente fuera menor en presencia de GxTx-1E, esto podría sugerir una alteración en la proporción de canales Kv2.1 o una alteración en su activación lo que tendría como consecuencia una mayor secreción de insulina.

Kv2.1 es el canal más estudiado en la familia Kv2 debido a que no existen toxinas específicas que permitan el estudio de Kv2.2. Sin embargo, hoy en día existen herramientas moleculares que han facilitado su estudio, y han permitido demostrar que Kv2.2 también contribuye a la corriente de  $K^+$  en células  $\beta$  (Fu et al., 2017). De manera muy interesante al aplicar TEA un bloqueador no específico de canales de potasio, observamos que la corriente se reduce completamente en células control, mientras que en células tratadas queda un pequeño remanente de corriente. Una posible explicación a esto es que los canales Kv2 estén formando tetrámeros con subunidades de otra familia de canales de potasio, que podrían silenciarlos o alterar su función (Bocksteins & Snyders, 2012). Los canales Kv 5, 6, 8 y 9 poseen subunidades eléctricamente silentes, que expresadas junto con subunidades de Kv2 son capaces de alterar sus propiedades farmacológicas y biofísicas, incluso en respuesta a toxinas como GxTx, ScTx e inhibidores como TEA (Bocksteins & Snyders, 2012; Bocksteins, 2016)

En el presente trabajo, tampoco encontramos diferencias en la dependencia de voltaje de la activación e inactivación en estado estable entre las células control en comparación con las tratadas con sacarosa al 20 %. La inactivación en estado

estable que observamos no llega a cero, lo anterior puede deberse a la capacidad de estos canales de formar heterotetrámeros y modificar sus propiedades biofísicas (Bocksteins, 2016). Además, los canales Kv2.1 presentan una inactivación tipo U, en la cual los canales ingresan al estado inactivo más favorablemente desde estados cerrados intermedios, que desde el estado abierto como ocurre en la inactivación tipo C (Cheng et al., 2011; Suarez-Delgado et al., 2019). La inactivación tipo U tiene como características que es incompleta (no llega cero) y no es monótona, es decir a potenciales más positivos la corriente, no solo no se inactiva, sino que parece aumentar, generando un efecto en la curva parecido a una U. Este tipo de comportamiento tipo U no solo se observa en canales Kv2.1 (Klemic et al., 1998), se ha reportado también en canales Kv1.2 (Suarez-Delgado et al., 2019).

La presencia de hiperinsulinemia y el hecho de que los canales Kv2 no sufrieron alteración en sus propiedades biofísicas, sugiere que otros canales como los canales de Nav, Cav y  $K_{ATP}$ , que participan en el proceso de secreción de insulina estimulada por glucosa, sean afectados por el tratamiento con sacarosa. Trabajos previos en nuestro laboratorio usando el modelo de síndrome metabólico de 8 semanas de tratamiento, han descartado la participación de los canales de  $Na^+$  dependientes de voltaje (Nav), en en la hiperinsulinemia; sin embargo, los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje (Cav) si mostraron un aumento en su actividad (Ruiz, 2018), lo que se relaciona con la hiperinsulinemia que observamos en el presente estudio. De hecho, la contribución de los canales Cav en las célula  $\beta$  es muy importante debido a que la entrada de  $Ca^{2+}$  es determinante para la exocitosis de la insulina (Göpel et al., 1999; Yuk M. Leung et al., 2005)

De manera interesante, en el caso de los canales de potasio sensibles a ATP ( $K_{ATP}$ ), el efecto del síndrome metabólico parece estar relacionado con el tiempo de tratamiento con la sacarosa, ya que, a las 8 semanas de tratamiento no se afectan la sensibilidad al ATP (Cruz-Cruz et al., 2022). Sin embargo, a las 24 semanas de tratamiento, los canales  $K_{ATP}$  son más sensibles al ATP en comparación con los de células  $\beta$  obtenidas de animales control (Velasco et al., 2012).

También analizamos la expresión de los canales de potasio Kv2.1 y Kv2.2 mediante inmunofluorescencia y tampoco encontramos diferencias entre las condiciones control y tratada, para ambos canales. Las imágenes de inmunofluorescencia muestran claramente la presencia de Kv2.1 y Kv2.2 confirmando la presencia de estos canales en estas células  $\beta$  pancreáticas. Anteriormente se había mostrado que Kv2.2 estaba presente solo en células  $\delta$ , donde regula la secreción de somatostatina (Li et al., 2013), mientras que las células  $\beta$  carecían de este canal (Wolf-Goldberg et al., 2006; Yan et al., 2004). Sin embargo, mediante el uso de herramientas moleculares más específicas, se demostró que los canales Kv2.1 y Kv2.2 están presentes en las células  $\beta$  tanto de ratón como de humano (Fu et al., 2017; Jensen et al., 2013). Además, en el presente trabajo, se confirmó la presencia de ambos tipos de canales en las células  $\beta$  de rata.

El campo de estudio de los canales Kv en las células  $\beta$  es importante, ya que además de los Kv2.1 y Kv2.2 también se encuentran los Kv 1.4, 1.5, 1.6, 3.2, 6.2 y 9.3 (Yang et al., 2014). Sin embargo, la información sobre estos canales en condiciones de SM es escasa, principalmente la de los Kv2 que son los que mayor participación tienen en la corriente de  $K^+$ . Esto hace importante a nuestro estudio ya que proporcionó información acerca de la biofísica de la familia de canales Kv2 en condiciones de SM después de un tratamiento con sacarosa al 20 %.

## Conclusión

Nuestro estudio muestra que, a pesar de los cambios metabólicos como la obesidad, hipertrigliceridemia, resistencia a la insulina e hiperinsulinemia que se desarrolla en etapas tempranas del síndrome metabólico, esta condición no afecta ni a la función ni a las propiedades biofísicas o abundancia de los canales de potasio Kv2.1 y Kv2.2.

## Referencias bibliográficas

- Aggarwal, S. K., & MacKinnon, R. (1996). Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K<sup>+</sup> channel. *Neuron*, 16(6), 1169–1177. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80143-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80143-9)
- Aguilar-Salinas, C. A., Rojas, R., Gómez-Pérez, F. J., Valles, V., Ríos-Torres, J. M., Franco, A., Olaiz, G., Rull, J. A., & Sepúlveda, J. (2004). High prevalence of metabolic syndrome in Mexico. *Archives of Medical Research*, 35(1), 76–81. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2003.06.006>
- Aguilera, A. A., Díaz, G. H., Barcelata, M. L., Guerrero, O. A., & Oliart Ros, R. M. (2004). Effects of fish oil on hypertension, plasma lipids, and tumor necrosis factor- $\alpha$  in rats with sucrose-induced metabolic syndrome. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 15(6), 350–357. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2003.12.008>
- Ahima, R. S., & Lazar, M. A. (2008). Adipokines and the peripheral and neural control of energy balance. *Molecular Endocrinology*, 22(5), 1023–1031. <https://doi.org/10.1210/me.2007-0529>
- Arias-Chávez, D. J., Mailloux-Salinas, P., Altamirano, J., Huang, F., Gómez-Viquez, N. L., & Bravo, G. (2022). Consumption of combined fructose and sucrose diet exacerbates oxidative stress, hypertrophy and CaMKII $\delta$  oxidation in hearts from rats with metabolic syndrome. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 477(4), 1309–1320. <https://doi.org/10.1007/s11010-022-04364-w>
- Aschner, P. (2010). Metabolic syndrome as a risk factor for neurological disorders. *Expert Reviewsviews*, 8(3), 407–412. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0840-1>
- Avena, N. M., Rada, P., & Hoebel, B. G. (2008). Evidence for sugar addiction: Behavioral and neurochemical effects of intermittent, excessive sugar intake. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 32(1), 20–39. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2007.04.019>
- Bedinger, D. H., & Adams, S. H. (2015). Metabolic, anabolic, and mitogenic insulin responses: A tissue-specific perspective for insulin receptor activators. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 415, 143–156. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.08.013>
- Bezanilla, F. (2005). The voltage-sensor structure in a voltage-gated channel. *Trends in Biochemical Sciences*, 30(4), 166–168. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.02.006>
- Bocksteins, E. (2016). Kv5, Kv6, Kv8, and Kv9 subunits: No simple silent

- bystanders. *Journal of General Physiology*, 147(2), 105–125.  
<https://doi.org/10.1085/jgp.201511507>
- Bocksteins, E., & Snyders, D. J. (2012). Electrically silent Kv subunits: Their molecular and functional characteristics. *Physiology*, 27(2), 73–84.  
<https://doi.org/10.1152/physiol.00023.2011>
- Bonner-Weir, S., Sullivan, B. A., & Weir, G. C. (2015). Human Islet Morphology Revisited: Human and Rodent Islets Are Not So Different After All. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 63(8), 604–612.  
<https://doi.org/10.1369/0022155415570969>
- Boron, W. F., & Boulpaep, E. L. (2017). *Fisiología médica* (Tercera ed). Elsevier.
- Bosmans, F., Martin-Eauclaire, M. F., & Swartz, K. J. (2008). Deconstructing voltage sensor function and pharmacology in sodium channels. *Nature*, 456(7219), 202–208. <https://doi.org/10.1038/nature07473>
- Campbell, J. E., & Newgard, C. B. (2021). Mechanisms controlling pancreatic islet cell function in insulin secretion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 22(February), 142–158. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00317-7>
- Chen, C., Hosokawa, H., Bumbalo, L. M., & Leahy, J. L. (1994). Regulatory effects of glucose on the catalytic activity and cellular content of glucokinase in the pancreatic  $\beta$  cell. Study using cultured rat islets. *Journal of Clinical Investigation*, 94(4), 1616–1620. <https://doi.org/10.1172/JCI117503>
- Chen, G. C., Huang, C. Y., Chang, M. Y., Chen, C. H., Chen, S. W., Huang, C. J., & Chao, P. M. (2011). Two unhealthy dietary habits featuring a high fat content and a sucrose-containing beverage intake, alone or in combination, on inducing metabolic syndrome in Wistar rats and C57BL/6J mice. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 60(2), 155–164.  
<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2009.12.002>
- Cheng, Y. M., Azer, J., Niven, C. M., Mafi, P., Allard, C. R., Qi, J., Thouta, S., & Claydon, T. W. (2011). Molecular determinants of U-type inactivation in Kv2.1 channels. *Biophysical Journal*, 101(3), 651–661.  
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.06.025>
- Cruz-cruz, I., Bernate-obando, G., Larqué, C., Escalona, R., Pinto-almazán, R., & Velasco, M. (2022). Early Effects of Metabolic Syndrome on ATP-Sensitive Potassium Channels from Rat Pancreatic Beta Cells. *Metabolites*, 12(4).  
<https://doi.org/10.3390/metabo12040365>
- Cruz, E. M. S., Morais, J. M. B. De, Rosa, C. V. D. Da, Simoes, M. D. S., Comar, J. F., Chuffa, L. G. D. A., & Seiva, F. R. F. (2020). Long-term sucrose solution consumption causes metabolic alterations and affects hepatic oxidative stress in Wistar rats. *Biology Open*, 9(3), 1–8. <https://doi.org/10.1242/bio.047282>

- Del Camino, D., & Yellen, G. (2001). Tight steric closure at the intracellular activation gate of a voltage-gated K<sup>+</sup> channel. *Neuron*, 32(4), 649–656. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00487-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00487-1)
- Dolenšek, J., Rupnik, M. S., & Stožer, A. (2015). Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas. *Islets*, 7(1), 2–9. <https://doi.org/10.1080/19382014.2015.1024405>
- Doyle, D. A., Cabral, J. M., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., & MacKinnon, R. (1998). The structure of the potassium channel: Molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science*, 280(5360), 69–77. <https://doi.org/10.1126/science.280.5360.69>
- Eckel, R. H., Alberti, K. G. M. M., Grundy, S. M., & Zimmet, P. Z. (2010). The metabolic syndrome. *The Lancet*, 375(9710), 181–183. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61794-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61794-3)
- El Hafidi, M., Cuéllar, A., Ramírez, J., & Baos, G. (2001). Effect of sucrose addition to drinking water, that induces hypertension in the rats, on liver microsomal  $\Delta 9$  and  $\Delta 5$ -desaturase activities. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 12(7), 396–403. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(01\)00154-1](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(01)00154-1)
- Erion, K., & Corkey, B. E. (2018a). B-Cell Failure or B-Cell Abuse? *Frontiers in Endocrinology*, 9(SEP), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00532>
- Erion, K., & Corkey, B. E. (2018b).  $\beta$ -cell failure or  $\beta$ -cell abuse? In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 9, Issue SEP). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00532>
- Fernández-Mariño, A. I., Tan, X. F., Bae, C., Huffer, K., Jiang, J., & Swartz, K. J. (2023). Inactivation of the Kv2.1 channel through electromechanical coupling. *Nature*, 622(7982), 410–417. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06582-8>
- Ferrannini, E., Gastaldelli, A., Miyazaki, Y., Matsuda, M., Mari, A., & DeFronzo, R. A. (2005).  $\beta$ -cell function in subjects spanning the range from normal glucose tolerance to overt diabetes: A new analysis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 90(1), 493–500. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-1133>
- Fink, M., Duprat, F., Lesage, F., Heurteaux, C., Romey, G., Barhanin, J., & Lazdunski, M. (1996). A new K<sup>+</sup> channel  $\beta$  subunit to specifically enhance Kv2.2 (CDRK) expression. *Journal of Biological Chemistry*, 271(42), 26341–26348. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.42.26341>
- Frech, G. C., VanDongen, A. M. J., Schuster, G., Brown, A. M., & Joho, R. H. (1989). A novel potassium channel with delayed rectifier properties isolated from rat brain by expression cloning. *Nature*, 340(6235), 642–645. <https://doi.org/10.1038/340642a0>

- Fu, J., Dai, X., Plummer, G., Suzuki, K., Bautista, A., Githaka, J. M., Senior, L., Jensen, M., Greitzer-Antes, D., Fox, J. E. M., Gaisano, H. Y., Newgard, C. B., Touret, N., & MacDonald, P. E. (2017). Kv2.1 clustering contributes to insulin exocytosis and rescues human  $\beta$ -cell dysfunction. *Diabetes*, *66*(7), 1890–1900. <https://doi.org/10.2337/db16-1170>
- Gandasi, N. R., Yin, P., Omar-Hmeadi, M., Ottosson Laakso, E., Vikman, P., & Barg, S. (2018). Glucose-Dependent Granule Docking Limits Insulin Secretion and Is Decreased in Human Type 2 Diabetes. *Cell Metabolism*, *27*(2), 470–478.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.12.017>
- Gerber, S. H., & Sudhof, T. C. (2002). Section 1: Insulin Release: Some Molecular Requisites Molecular Determinants of Regulated Exocytosis. *Diabetes*, *51*(3), 3–11.
- González, C., Baez-Nieto, D., Valencia, I., Oyarzún, I., Rojas, P., Naranjo, D., & Latorre, R. (2012). K<sup>+</sup> channels: Function-structural overview. *Comprehensive Physiology*, *2*(3), 2087–2149. <https://doi.org/10.1002/cphy.c110047>
- Göpel, S., Kanno, T., Barg, S., Galvanovskis, J., & Rorsman, P. (1999). Voltage-gated and resting membrane currents recorded from B-cells in intact mouse pancreatic islets. *Journal of Physiology*, *521*(3), 717–728. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.00717.x>
- Gravagna, N. G., & Ribera, A. B. (2009). Potassium Channel Regulation. *Encyclopedia of Neuroscience*, 859–865. <https://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.01639-9>
- Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T., & MacKinnon, R. (1994). Mutations in the K<sup>+</sup> channel signature sequence. *Biophysical Journal*, *66*(4), 1061–1067. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(94\)80887-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(94)80887-2)
- Heiss, G., Snyder, M. L., Teng, Y., Schneiderman, N., Llabre, M. M., Cowie, C., Carnethon, M., Kaplan, R., Giachello, A., Gallo, L., Loehr, L., & Avilés-Santa, L. (2014). Prevalence of metabolic syndrome among hispanics/latinos of diverse background: The Hispanic Community Health Study/Study of Latinos. *Diabetes Care*, *37*(8), 2391–2399. <https://doi.org/10.2337/dc13-2505>
- Herrington, J. (2007). Gating modifier peptides as probes of pancreatic  $\beta$ -cell physiology. *Toxicon*, *49*(2), 231–238. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.09.012>
- Herrington, J., Zhou, Y.-P., Bugianesi, R. M., Dulski, P. M., Feng, Y., Warren, V. A., Smith, M. M., Kohler, M. G., Garsky, V. M., Sanchez, M., Wagner, M., Raffaelli, K., Banerjee, P., Ahaghotu, C., Wunderler, D., Priest, B. T., Mehl, J. T., Garcia, M. L., Mcmanus, O. B., ... Slaughter, R. S. (2006a). *Blockers of the Delayed-Rectifier Potassium Current in Pancreatic-Cells Enhance Glucose-Dependent Insulin Secretion*. <http://diabetesjournals.org/diabetes/article->

- Herrington, J., Zhou, Y., Bugianesi, R. M., Dulski, P. M., Feng, Y., Warren, V. A., Smith, M. M., Kohler, M. G., Garsky, V. M., Sanchez, M., Wagner, M., Raphaelli, K., Banerjee, P., Ahaghotu, C., Wunderler, D., Priest, B. T., Mehl, J. T., Garcia, M. L., Mcmanus, O. B., ... Slaughter, R. S. (2006b). Blockers of the Delayed-Rectifier Potassium Current in Pancreatic  $\beta$ -Cells Enhance Glucose-Dependent Insulin Secretion. *Diabetes*, 55(April), 1751–1760.
- Hiriart, M., & Aguilar-Bryan, L. (2008). Channel regulation of glucose sensing in the pancreatic  $\beta$ -cell. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 295(6), 1298–1306. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90493.2008>
- Hiriart, M., Velasco, M., Diaz-Garica, C. M., Larqué, C., Sanchez-Soto, C., Albarado-Ibañez, J. P., Chavez-Maldonado, J. P., Toledo, A., & Garcia-Delgado, N. (2015). Pancreatic  $\beta$  Cells in Metabolic Syndrome. In I. Shahidu (Ed.), *Islets of Langerhans, Second Edition* (Segunda ed, pp. 1–1415). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6686-0>
- Hiriart, M., Velasco, M., Larqué, C., & Diaz-Garcia, C. M. (2014). Metabolic syndrome and ionic channels in pancreatic beta cells. In *Vitamins and Hormones* (Vol. 95, pp. 87–114). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800174-5.00004-1>
- Hoshi, T., Zagotta, W. N., & Aldrich, R. W. (1991). Two types of inactivation in Shaker K<sup>+</sup> channels: Effects of alterations in the carboxy-terminal region. *Neuron*, 7(4), 547–556. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(91\)90367-9](https://doi.org/10.1016/0896-6273(91)90367-9)
- Hotamisligil, G. S. (2017). Foundations of Immunometabolism and Implications for Metabolic Health and Disease. *Immunity*, 176(1), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.08.009>.Foundations
- Huang, H. H., Harrington, S., & Stehno-Bittel, L. (2018). The Flaws and Future of Islet Volume Measurements. *Cell Transplantation*, 27(7), 1017–1026. <https://doi.org/10.1177/0963689718779898>
- Huang, P. L. (2009). A comprehensive definition for metabolic syndrome. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 2(5–6), 231–237. <https://doi.org/10.1242/dmm.001180>
- Hwang, P. M., Glatt, C. E., Bredt, D. S., Yellen, G., & Snyder, S. H. (1992). A novel K<sup>+</sup> channel with unique localizations in mammalian brain: Molecular cloning and characterization. *Neuron*, 8(3), 473–481. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(92\)90275-I](https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90275-I)
- Jacobson, D. A., Kuznetsov, A., Lopez, J. P., Kash, S., Ämmälä, C. E., & Philipson, L. H. H. (2007). Kv2.1 Ablation Alters Glucose-Induced Islet Electrical Activity, Enhancing Insulin Secretion. *Cell Metabolism*, 6(3), 229–235.

<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.07.010>

Jensen, M. V., Haldeman, J. M., Zhang, H., Lu, D., Huising, M. O., Vale, W. W., Hohmeier, H. E., Rosenberg, P., & Newgard, C. B. (2013). Control of voltage-gated potassium channel Kv2.2 expression by pyruvate-isocitrate cycling regulates glucose-stimulated insulin secretion. *Journal of Biological Chemistry*, 288(32), 23128–23140. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.491654>

Jo, J. (2020). Islet architecture. *Diabetes Systems Biology*, 1(2), 4-1-4–13. <https://doi.org/10.1088/978-0-7503-3739-7ch4>

Kassi, E., Pervanidou, P., Kaltsas, G., & Chrousos, G. (2011). Metabolic syndrome: Definitions and controversies. *BMC Medicine*, 9(1), 48. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-9-48>

Kawai, T., Autieri, M. V., & Scalia, R. (2021). Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 320(3), C375–C391. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00379.2020>

Kihira, Y., Hermansteyne, T. O., & Misonou, H. (2010). Formation of heteromeric Kv2 channels in mammalian brain neurons. *Journal of Biological Chemistry*, 285(20), 15048–15055. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.074260>

Kilimnik, G., Jo, J., Perival, V., Zielinski, M. C., & Hara, M. (2012). Quantification of islet size and architecture. *Islets*, 4(2), 167–172. <https://doi.org/10.4161/isl.19256>

Klemic, K. G., Shieh, C. C., Kirsch, G. E., & Jones, S. W. (1998). Inactivation of Kv2.1 potassium channels. *Biophysical Journal*, 74(4), 1779–1789. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)77888-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77888-9)

Kulkarni, A., Muralidharan, C., May, S. C., Tersey, S. A., & Mirmira, R. G. (2023). Inside the  $\beta$  Cell: Molecular Stress Response Pathways in Diabetes Pathogenesis. *Endocrinology*, 164(1), 1–15. <https://doi.org/10.1210/endocr/bqac184>

Kuryshv, Y. A., Gudz, T. I., Brown, A. M., & Wible, B. A. (2000). KChAP as a chaperone for specific K<sup>+</sup> channels. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 278(5 47-5), 931–941. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2000.278.5.c931>

Larqu e, C., Velasco, M., Navarro-Tableros, V., Duhne, M., Aguirre, J., Guti errez-Reyes, G., Moreno, J., Robles-Diaz, G., Hong, E., & Hiriart, M. (2011). Early endocrine and molecular changes in metabolic syndrome models. *IUBMB Life*, 63(10), 831–839. <https://doi.org/10.1002/iub.544>

Lee, S., Milesu, M., Jung, H. H., Lee, J. Y., Bae, C. H., Lee, C. W., Kim, H. H., Swartz, K. J., & Kim, J. II. (2010). Solution structure of GxTX-1E, a high-affinity

- tarantula toxin interacting with voltage sensors in Kv2.1 potassium channels. *Biochemistry*, 49(25), 5134–5142. <https://doi.org/10.1021/bi100246u>
- Leung, Yuk M., Ahmed, I., Sheu, L., Tsushima, R. G., Diamant, N. E., Hara, M., & Gaisano, H. Y. (2005). Electrophysiological characterization of pancreatic islet cells in the mouse insulin promoter-green fluorescent protein mouse. *Endocrinology*, 146(11), 4766–4775. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0803>
- Leung, Yuk Man. (2012). Involvement of C-type inactivation gating in the actions of voltage-gated K<sup>+</sup> channel inhibitors. *Pharmacology and Therapeutics*, 133(2), 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2011.10.005>
- Li, X. N., Herrington, J., Petrov, A., Ge, L., Eiermann, G., Xiong, Y., Jensen, M. V., Hohmeier, H. E., Newgard, C. B., Garcia, M. L., Wagner, M., Zhang, B. B., Thornberry, N. A., Howard, A. D., Kaczorowski, G. J., & Zhou, Y. P. (2013). The role of voltage-gated potassium channels Kv2.1 and Kv2.2 in the regulation of insulin and somatostatin release from pancreatic islets. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 344(2), 407–416. <https://doi.org/10.1124/jpet.112.199083>
- Liu, Y., Holmgren, M., Jurman, M. E., & Yellen, G. (1997). Gated access to the pore of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. *Neuron*, 19(1), 175–184. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80357-8](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80357-8)
- Liu, Y. Q., Jetton, T. L., & Leahy, J. L. (2002).  $\beta$ -cell adaptation to insulin resistance. Increased pyruvate carboxylase and malate-pyruvate shuttle activity in islets of nondiabetic Zucker fatty rats. *Journal of Biological Chemistry*, 277(42), 39163–39168. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207157200>
- Macdonald, P. E., Ha, X. F., Wang, J., Smukler, S. R., Sun, A. M., Gaisano, H. Y., Salapatek, A. M. F., Backx, P. H., & Wheeler, M. B. (2001). Members of the Kv1 and Kv2 voltage-dependent K<sup>+</sup> channel families regulate insulin secretion. *Molecular Endocrinology*, 15(8), 1423–1435. <https://doi.org/10.1210/mend.15.8.0685>
- MacDonald, P. E., Salapatek, A. M. F., & Wheeler, M. B. (2003). Temperature and redox state dependence of native Kv2.1 currents in rat pancreatic  $\beta$ -cells. *Journal of Physiology*, 546(3), 647–653. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.035709>
- MacDonald, P. E., Sewing, S., Wang, J., Joseph, J. W., Smukler, S. R., Sakellaropoulos, G., Wang, J., Saleh, M. C., Chan, C. B., Tsushima, R. G., Salapatek, A. M. F., & Wheeler, M. B. (2002). Inhibition of Kv2.1 voltage-dependent K<sup>+</sup> channels in pancreatic  $\beta$ -cells enhances glucose-dependent insulin secretion. *Journal of Biological Chemistry*, 277(47), 44938–44945. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205532200>
- Mahadevan, V. (2016). Anatomy of the pancreas and spleen. *Surgery (United*

- Kingdom), 34(6), 261–265. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2016.03.014>
- Makhmutova, M., & Caicedo, A. (2021). Optical Imaging of Pancreatic Innervation. *Frontiers in Endocrinology*, 12(April), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.663022>
- Malik, V. S., Popkin, B. M., Bray, G. A., Després, J. P., Willett, W. C., & Hu, F. B. (2010). Sugar-sweetened beverages and risk of metabolic syndrome and type 2 diabetes: A meta-analysis. *Diabetes Care*, 33(11), 2477–2483. <https://doi.org/10.2337/dc10-1079>
- Malik, V. S., Schulze, M. B., & Hu, F. B. (2006). Intake of sugar-sweetened beverages and weight gain: A systematic review. *American Journal of Clinical Nutrition*, 84(2), 274–288. <https://doi.org/10.1093/ajcn/84.1.274>
- Mark, A., Martha, C., Irina, K., & Klaus, K. (2018). Organisation of the human pancreas in health and in diabetes. *Diabetologia*, 176(1), 139–148. <https://doi.org/10.1007/s00125-020-05203-7>.Organisation
- Mathie, A., Al-Moubarak, E., & Veale, E. L. (2010). Gating of two pore domain potassium channels. *Journal of Physiology*, 588(17), 3149–3156. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.192344>
- Melo, B. F., Sacramento, J. F., Ribeiro, M. J., Prego, C. S., Correia, M. C., Coelho, J. C., Cunha-guimaraes, J. P., Rodrigues, T., Martins, I. B., Guarino, M. P., Seica, R. M., Matafome, P., & Conde, S. V. (2019). Evaluating the Impact of Different Hypercaloric Diets on Weight Gain, Insulin Resistance, Glucose Intolerance, and its Comorbidities in Rats. *Nutrients*, 11, 1–19.
- Michaevlevski, I., Chikvashvili, D., Tsuk, S., Singer-Lahat, D., Kang, Y., Linial, M., Gaisano, H. Y., Fili, O., & Lotan, I. (2003). Direct interaction of target SNAREs with the Kv2.1 channel: Modal regulation of channel activation and inactivation gating. *Journal of Biological Chemistry*, 278(36), 34320–34330. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304943200>
- Mohapatra, D. P., Park, K. S., & Trimmer, J. S. (2007). Dynamic regulation of the voltage-gated Kv2.1 potassium channel by multisite phosphorylation. *Biochemical Society Transactions*, 35(5), 1064–1068. <https://doi.org/10.1042/BST0351064>
- Moreno-Fernández, S., Garcés-Rimón, M., Vera, G., Astier, J., Landrier, J. F., & Miguel, M. (2018). High fat/high glucose diet induces metabolic syndrome in an experimental rat model. *Nutrients*, 10(10), 1–15. <https://doi.org/10.3390/nu10101502>
- Nagatomo, T., Fan, Z., Ye, B., Tonkovich, G. S., January, C. T., Kyle, J. W., & Makielski, J. C. (1998). Temperature dependence of early and late currents in human cardiac wild-type and long Q-T  $\Delta$ KPQ Na<sup>+</sup> channels. *American*

*Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 275(6 44-6), 2016–2024. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1998.275.6.h2016>

- Nagaya, N., & Papazian, D. M. (1997). Potassium channel  $\alpha$  and  $\beta$  subunits assemble in the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 272(5), 3022–3027. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.5.3022>
- Newsholme, P., Cruzat, V., Arfuso, F., & Keane, K. (2014). Nutrient regulation of insulin secretion and action. *Journal of Endocrinology*, 221(3). <https://doi.org/10.1530/JOE-13-0616>
- Ning, J., Zhang, Y., Hu, H., Hu, W., Li, L., Pang, Y., Ma, S., Niu, Y., & Zhang, R. (2021). Association between ambient particulate matter exposure and metabolic syndrome risk: A systematic review and meta-analysis. *Science of the Total Environment*, 782, 146855. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146855>
- Niswender, K. D. (2011). Basal insulin: Physiology, pharmacology, and clinical implications. *Postgraduate Medicine*, 123(4), 17–26. <https://doi.org/10.3810/pgm.2011.07.2300>
- Nolan, C. J., & Prentki, M. (2019). Insulin resistance and insulin hypersecretion in the metabolic syndrome and type 2 diabetes: Time for a conceptual framework shift. In *Diabetes and Vascular Disease Research* (Vol. 16, Issue 2, pp. 118–127). SAGE Publications Ltd. <https://doi.org/10.1177/1479164119827611>
- O'Grady, S. M., & Lee So, Y. (2005). Molecular diversity and function of voltage-gated (Kv) potassium channels in epithelial cells. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 37(8), 1578–1594. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.04.002>
- Prentki, M., & Nolan, C. J. (2006). Islet  $\beta$  cell failure in type 2 diabetes. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 116, Issue 7, pp. 1802–1812). <https://doi.org/10.1172/JCI29103>
- Rabhi, N., Salas, E., Froguel, P., & Annicotte, J. S. (2014). Role of the unfolded protein response in  $\beta$  cell compensation and failure during diabetes. In *Journal of Diabetes Research* (Vol. 2014). Hindawi Publishing Corporation. <https://doi.org/10.1155/2014/795171>
- Rettig, J., Heinemann, S. H., Wunder, F., Lorra, C., Parcej, D. N., Dolly, J. O., & Pongs, O. (1994). Inactivation properties of voltage-gated K<sup>+</sup> channels altered by presence of B-subunits. *Nature*, 369, 289–294.
- Rochlani, Y., Pothineni, N. V., & Mehta, J. L. (2015). Metabolic syndrome: Does it differ between women and men? *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 29(4), 329–338. <https://doi.org/10.1007/s10557-015-6593-6>

- Röder, P. V., Wu, B., Liu, Y., & Han, W. (2016). Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Experimental & Molecular Medicine*, 48(December 2015), e219. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.6>
- Roe, M. W., Worley, J. F., Mittal, A. A., Kuznetsov, A., Dasgupta, S., Mertz, R. J., Witherspoon, S. M., Blair, N., Lancaster, M. E., McIntyre, M. S., Ronald Shehee, W., Dukes, I. D., & Philipson, L. H. (1996). Expression and function of pancreatic  $\beta$ -cell delayed rectifier K<sup>+</sup> channels. Role in stimulus-secretion coupling. *Journal of Biological Chemistry*, 271(50), 32241–32246. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.50.32241>
- Ruiz, M. E. (2018). *Caracterización electrofisiológica de los canales de sodio sensibles a voltaje en células beta pancreáticas de rata con síndrome metabólico*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Sclafani, A., & Xenakis, S. (1984). Sucrose and polysaccharide induced obesity in the rat. *Physiology and Behavior*, 32(2), 169–174. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(84\)90125-2](https://doi.org/10.1016/0031-9384(84)90125-2)
- Suarez-Delgado, E., Rangel-Sandín, T. G., Ishida, I. G., Rangel-Yescas, G. E., Rosenbaum, T., & Islas, L. D. (2019). I<sub>2</sub> channels inactivate through a mechanism similar to C-type inactivation. *Journal of General Physiology*, 152(6), 0–2.
- Swartz, K. J. (2008). Sensing voltage across lipid membranes. *Nature*, 456(7224), 891–897. <https://doi.org/10.1038/nature07620>
- Tamarima, N. A., Kuznetsov, A., Fridlyand, L. E., & Philipson, L. H. (2005). Delayed-rectifier (Kv2.1) regulation of pancreatic  $\beta$ -cell calcium responses to glucose: Inhibitor specificity and modeling. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 289(4 52-4), 578–585. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00054.2005>
- Thevis, M., Thomas, A., & Wilhelm, S. (2010). Insulin. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 195, 209–226. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-79088-4>
- Vakilian, M., Tahamtani, Y., & Ghaedi, K. (2019). A review on insulin trafficking and exocytosis. *Gene*, 706(January), 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.04.063>
- Velasco, M., Larqué, C., Díaz-García, C. M., Sanchez-Soto, C., & Hiriart, M. (2018). Rat pancreatic beta-cell culture. *Methods in Molecular Biology*, 1727, 261–273. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7571-6\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7571-6_20)
- Velasco, M., Larqué, C., Gutierrez-Reyes, G., Arredondo, R., Sanchez-Soto, C., & Hiriart, M. (2012). *Metabolic syndrome induces changes in KATP-channels and calcium currents in*. 23(August), 903–913. <https://doi.org/10.4161/cam.20753>

- Velasco, M., Ortiz-Huidobro, R. I., Larqué, C., Sánchez-Zamora, Y. I., Romo-Yáñez, J., & Hiriart, M. (2020). Sexual dimorphism in insulin resistance in a metabolic syndrome rat model. *Endocrine Connections*, 9(9), 890–902. <https://doi.org/10.1530/EC-20-0288>
- Wolf-Goldberg, T., Michaelevski, I., Sheu, L., Gaisano, H. Y., Chikvashvili, D., & Lotan, I. (2006). Target soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors (t-SNARES) differently regulate activation and inactivation gating of Kv2.2 and Kv2.1: Implications on pancreatic islet cell Kv channels. *Molecular Pharmacology*, 70(3), 818–828. <https://doi.org/10.1124/mol.105.021717>
- Xia, F., Gao, X., Kwan, E., Lam, P. P. L., Chan, L., Sy, K., Sheu, L., Wheeler, M. B., Gaisano, H. Y., & Tsushima, R. G. (2004). Disruption of pancreatic  $\beta$ -cell lipid rafts modifies Kv2.1 channel gating and insulin exocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, 279(23), 24685–24691. <https://doi.org/10.1074/jbc.M314314200>
- Xiao, Y., Tang, J., Yang, Y., Wang, M., Hu, W., Xie, J., Zeng, X., & Liang, S. (2004). Jingzhaotoxin-III, a novel spider toxin inhibiting activation of voltage-gated sodium channel in rat cardiac myocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 279(25), 26220–26226. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401387200>
- Xiong, Q.-Y., Yu, C., Zhang, Y., Ling, L., Wang, L., & Gao, J.-L. (2017). Key proteins involved in insulin vesicle exocytosis and secretion. *Biomedical Reports*, 6(2), 134–139. <https://doi.org/10.3892/br.2017.839>
- Xu, P., Liu, A., Li, F., Tinkov, A. A., Liu, L., & Zhou, J. C. (2021). Associations between metabolic syndrome and four heavy metals: A systematic review and meta-analysis. *Environmental Pollution*, 273, 116480. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116480>
- Yan, L., Figueroa, D. J., Austin, C. P., Liu, Y., Bugianesi, R. M., Slaughter, R. S., Kaczorowski, G. J., & Kohler, M. G. (2004). Expression of Voltage-Gated Potassium Channels in Human and Rhesus Pancreatic Islets. *Diabetes*, 53(3), 597–607. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.3.597>
- Yang, S. N., Shi, Y., Yang, G., Li, Y., Yu, J., & Berggren, P. O. (2014). Ionic mechanisms in pancreatic  $\beta$  cell signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(21), 4149–4177. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1680-6>
- Yellen, G. (2002). The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature*, 419(6902), 35–42. <https://doi.org/10.1038/nature00978>
- Yuan, C., Yang, S., Liao, Z., & Liang, S. (2007). Effects and mechanism of Chinese Tarantula Toxins on the Kv2.1 potassium channels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 352(3), 799–804. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.11.086>

