

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS

ACOPLAMIENTO ENTRE EL ESTÍMULO Y LA SECRECIÓN  
DE INSULINA EN CÉLULAS BETA PANCREÁTICAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

BIOL. RICARDO CRUZ CRUZ

DIRECTORA DE TESIS:  
DRA. MARCIA HIRIART URDANIVIA

MÉXICO, D.F.

MAYO, 2005



COORDINACIÓN

m344676



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

## POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Ricardo Cruz Cruz

FECHA: 13/mayo/2005

FIRMA:

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 7 de marzo del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) Cruz Cruz Ricardo con número de cuenta 501093714 con la tesis titulada: "Acoplamiento entre el estímulo y la secreción de insulina en células  $\beta$  pancreáticas", bajo la dirección del(a) Dra. Marcia Hiriart Urdanivia .

Presidente:	Dr. Mauricio Díaz Muñoz
Vocal:	Dra. Hortensia González Gómez
Secretario:	Dra. Marcia Hiriart Urdanivia
Suplente:	Dra. Tamara Luti Rosenbaum Emir
Suplente:	Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F. a, 2 de mayo del 2005

Dr. Juan José Morrone Lupi  
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada durante la Maestría y a los responsables del donativo D39822 de la misma institución.

A los miembros de mi Comité Tutorial: Dra. Marcia Hiriart Urdanivia, Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez y Dra. Hortensia González Gómez, por la asesoría brindada a lo largo de la Maestría.

Al Comité de Evaluación: Dr. Mauricio Díaz Muñoz, Dra. Hortensia González Gómez, Dra. Marcia Hiriart Urdanivia, Dra. Tamara Luti Rosenbaum Emir y Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez por los acertados comentarios al escrito de la tesis.

A la Dra. Marcia Hiriart Urdanivia, por compartir su conocimiento, por guiar esta mente dispersa y sobre todo por su paciencia.

Al Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez porque su experiencia en el campo enriqueció este trabajo.

A Carmen Sánchez Soto por el apoyo experimental, por el tiempo dedicado a este proyecto y por estar conmigo en las buenas y en las malas.

A mis compañeros de laboratorio por los momentos compartidos durante mi estancia.

A Pedro, por la ayuda proporcionada en las cirugías.

## DEDICATORIAS

A mis Padres: Carlota Cruz Aguilar y Ricardo Cruz Monroy por ayudarme a salir adelante y por el cariño que me han brindado toda la vida.

A mis Hermanos: Sarilú y David porque sus logros son una motivación que me impulsa a seguir aún en las circunstancias más adversas y por las alegrías y tristezas que nos han hecho crecer juntos.

A mi tío Aurelio, por su cariño y apoyo incondicional.

A mis amigos: Hugo, Mario, Javier, Carlos y Benito porque aunque estén lejos, se que puedo contar con ellos siempre.

A la persona que cambio mí vida, Elvira: eres un ser humano maravilloso y una mujer ejemplar a la que amo, respeto y admiro profundamente, gracias por compartir tu vida conmigo.

## **In My Life**

(Lennon/McCartney)

*There are places I remember  
All my life though some have changed  
Some forever not for better  
Some have gone and some remain  
All these places have their moments  
With lovers and friends I still can recall  
Some are dead and some are living  
In my life I've loved them all*

*But of all these friends and lovers  
There is no one compares with you  
And these memories lose their meaning  
When I think of love as something new  
Though I know I'll never lose affection  
For people and things that went before  
I know I'll often stop and think about them  
In my life I love you more*

*Though I know I'll never lose affection  
For people and things that went before  
I know I'll often stop and think about them  
In my life I love you more  
In my life I love you more*

*Para: Elvira del Carmen Arellanes Licea*

## ÍNDICE

<b>I</b>	<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>II</b>	<b>ABSTRACT</b>	<b>3</b>
<b>III</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>4</b>
3.1	ESTRUCTURA DEL ISLOTE PANCREÁTICO	4
3.2	ESTRUCTURA DE LA INSULINA	5
3.3	EL ACOPLAMIENTO ENTRE LA ESTIMULACIÓN CON GLUCOSA Y LA SECRECIÓN DE INSULINA	7
3.3.1	Transporte y metabolismo de la glucosa en las células $\beta$ pancreáticas	7
3.3.2	La secreción de insulina es regulada por la actividad eléctrica de la célula $\beta$ pancreática.	8
3.3.3	Canales iónicos que participan en la actividad eléctrica estimulada por glucosa de las células $\beta$ pancreáticas	9
3.3.4	La corriente catiónica no selectiva	11
3.3.5	Los canales operados por almacenes (SOC)	13
3.3.6	Canales TRP	13
3.3.7	Depósitos intracelulares de $\text{Ca}^{2+}$	14
<b>IV</b>	<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>17</b>
<b>V</b>	<b>HIPÓTESIS</b>	<b>17</b>
<b>VI</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>18</b>
	General	18
	Particulares	18
<b>VII</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>19</b>
7.1	CULTIVOS DE CÉLULAS $\beta$ PANCREÁTICAS	19
7.2	REGISTRO DE LA CORRIENTE CATIÓNICA MEDIANTE LA TÉCNICA DE CONTROL DE VOLTAJE	20
7.3	MEDIDA DE LA SECRECIÓN DE INSULINA	22
7.3.1	Marcaje de los eritrocitos	23

7.3.2	Cámaras de Cunningham	23
7.3.3	Ensayo Hemolítico Inverso (RHPA)	24
7.3.4	Análisis de la secreción	24
<b>VIII</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>25</b>
8.1	DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE REGISTRO	25
8.2	EFECTO DE LA TAPSIGARGINA SOBRE LAS CORRIENTES TOTALES DE CÉLULAS $\beta$ PANCREÁTICAS	25
8.3	SELECTIVIDAD DE LA CORRIENTE	26
8.4	SECRECIÓN DE INSULINA	33
<b>IX</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>38</b>
<b>X</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>44</b>
<b>XI</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>45</b>
<b>XII</b>	<b>REFERENCIAS</b>	<b>46</b>



## I RESUMEN

La corriente catiónica no selectiva de las células  $\beta$  pancreáticas es muy importante en el inicio de la actividad eléctrica después del cierre de los canales KATP, ya que despolariza la membrana plasmática hasta el potencial al cual, incrementa la probabilidad de apertura de los canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles al voltaje.

Diversos grupos de trabajo han estudiado la participación de los canales de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{K}^+$  dependientes de voltaje y de los canales de  $\text{K}^+$  sensibles a ATP (KATP) en la actividad eléctrica de las células  $\beta$ , pero pocos han analizado la participación de los canales catiónicos no selectivos en este proceso.

Algunos grupos sugieren que uno de los mecanismos que puede activar la corriente catiónica no selectiva es el incremento en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , producida por el vaciamiento de los depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ . Una de las herramientas más utilizadas en este proceso, tanto en célula  $\beta$  como en otros tipos celulares, es la tapsigargina, la cual inhibe específicamente a la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico y produce una elevación de la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Datos previos de nuestro laboratorio muestran que la tapsigargina, induce la secreción de insulina en células  $\beta$  pancreáticas, pero se desconoce el mecanismo mediante el cual esto sucede. Por esta razón, en el presente trabajo analizamos el efecto de tapsigargina sobre la corriente catiónica y sobre la secreción de insulina de células  $\beta$  pancreáticas aisladas.

En este trabajo demostramos que la tapsigargina potencia una corriente catiónica ( $I_{\text{cat}}$ ) permeable principalmente al  $\text{Na}^+$ , en células  $\beta$  pancreáticas. Esta corriente despolariza la membrana plasmática lo cual, conduce a una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L y en consecuencia, se produce un incremento en la secreción de insulina. Esto es el resultado del aumento en la secreción de

insulina por células  $\beta$  aisladas y del incremento en el porcentaje de células secretoras.

Concluimos que el efecto de la tapsigargina potencia una  $I_{cat}$  que produce la despolarización de la membrana plasmática e inicia la actividad eléctrica, la entrada de  $Ca^{2+}$  y culmina con la elevación en la secreción de insulina. Estos efectos se atribuyen a la activación de canales catiónicos no selectivos.

## II ABSTRACT

Glucose-induced insulin secretion by pancreatic  $\beta$ -cells depends on the electrical activity of these cells and on the increase in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. Some of the channels which participate in this electrical activity are KATP channels,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  voltage-dependent channels and non-selective cationic channels. It has been previously suggested that non-selective cationic channels are involved in plasmatic membrane depolarization which occurs after the closure of KATP channels and then reaches a membrane potentials at which the opening probability of voltage-dependent  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  channels is increased. The non-selective cationic current can be activated by muscarinic agonists or as a consequence of the depletion of intracellular stores.

In this study we studied the effects of thapsigargin, a endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase inhibitor, on non-selective cationic currents and insulin secretion in pancreatic  $\beta$  cells.

We demonstrate that thapsigargin potentiates a cationic current ( $I_{\text{cat}}$ ) mainly carried by  $\text{Na}^+$  with a small contribution of  $\text{Ca}^{2+}$ . This current depolarizes the membrane, which leads to  $\text{Ca}^{2+}$  entry through L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels and this, in turn, increases insulin secretion by single rat  $\beta$ -cells. These effects are a result of the amplification of insulin secretion by individual cells and the recruitment of previously silent cells which, in control conditions, do not secrete a detectable amount of insulin.

We conclude that thapsigargin increases the activity of  $I_{\text{cat}}$ , which depolarizes the plasmatic membrane, initiates the electrical activity resulting in  $\text{Ca}^{2+}$  entry, and insulin secretion.

### III INTRODUCCIÓN

#### 3.1 ESTRUCTURA DEL ISLOTE PANCREÁTICO

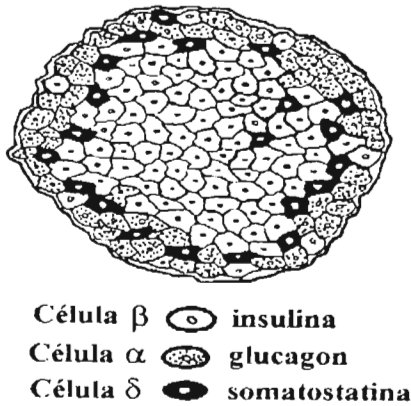
El páncreas de los mamíferos es una glándula con función mixta ya que lleva a cabo actividades exocrinas y endocrinas. Este órgano está compuesto por los acinos que drenan a un sistema de conductos y los islotes pancreáticos (Kim y Hebrock, 2001). La función exocrina la realizan las células acinares y el sistema epitelial ductal las primeras secretan enzimas digestivas hacia el conducto pancreático, el cual las transporta hasta el duodeno; y el sistema epitelial ductal secreta electrolitos, bicarbonato y agua.

Las funciones endocrinas las realizan los islotes pancreáticos que se encuentran distribuidos entre el tejido acinar y están formados por células  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y PP (Figura 1), las cuales vierten su secreción hacia los vasos que las irrigan.

Las células  $\alpha$  secretan glucagon en respuesta a hipoglucemia, en los roedores se encuentran principalmente en la periferia del islote y en el organismo adulto representan alrededor del 15 % de las células del islote.

Las células  $\delta$  secretan somatostatina y constituyen aproximadamente el 8 % del islote pancreático. La somatostatina inhibe la secreción de insulina y glucagon, así como de enzimas digestivas exocrinas (Samols y Stagner, 1990).

Las células  $\beta$ , comprenden alrededor del 80 % del islote pancreático y secretan insulina, la principal hormona hipoglucemiante de los mamíferos. Los efectos más importantes de la insulina son: inducir el ingreso de glucosa a tejidos periféricos como el músculo esquelético y tejido adiposo, y estimular el almacenamiento de carbohidratos, lípidos y aminoácidos (Saltiel, 1996).



**Figura 1.** Estructura del islote pancreático de rata. Las células  $\beta$  se encuentran localizadas principalmente en el centro del islote, las células  $\alpha$  y  $\delta$  están localizadas en la periferia del islote.

### 3.2 ESTRUCTURA DE LA INSULINA

El gen de la insulina está altamente conservado en todas las especies y consiste de 3 exones y 2 intrones. En el humano este se localiza en el brazo corto del cromosoma 11.

El exón 1 posee la secuencia que codifica para el extremo amino terminal de la proteína, el exón 2 codifica para el péptido señal, la cadena B y la primera parte del péptido C, mientras que el exón 3 codifica para la parte final del péptido C, la cadena A y el carboxilo terminal. En casi todas las especies de mamíferos existe una sola copia del gen de la insulina, con excepción de la rata y el ratón, los cuales presentan 2 genes no alélicos (Llomedico y col., 1979 y Wentworth y col., 1986).

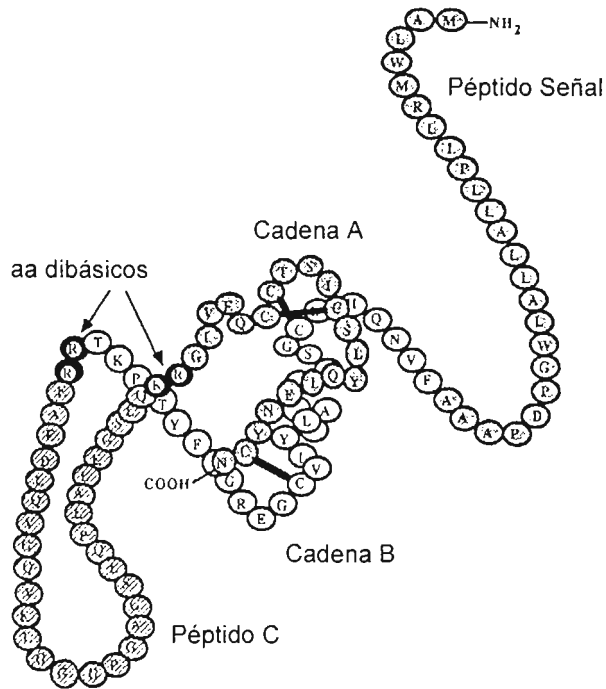
El RNA mensajero es traducido a preproinsulina (Figura 2), la cual está formada por el péptido señal (24 aminoácidos), la cadena B (30 aminoácidos), el péptido C (30 aminoácidos) y la cadena A (21 aminoácidos). El péptido señal es importante en la proteína naciente ya que funciona como sitio de reconocimiento de proteínas que serán procesadas en el retículo endoplásmico rugoso y en el aparato de Golgi.

Después de la translocación de la preproinsulina al retículo endoplásmico, el péptido señal es removido por peptidasas presentes en el lumen del retículo endoplásmico generando proinsulina.

En el retículo endoplásmico la proinsulina adquiere una conformación tridimensional estable, gracias a la formación de dos puentes disulfuro intercatenarios. El primero une a la cisteína 7 de la cadena A con la 7 de la cadena B y el segundo a la cisteína 20 de la cadena A con la 19 de la cadena B. Existe un tercer puente disulfuro intracatenario que une a la cisteína 6 y a la 11 de la cadena A.

La proinsulina sale del retículo endoplásmico y viaja a través del aparato de Golgi por medio de transporte vesicular. Los gránulos de secreción que contienen proinsulina, se forman en las cisternas del *trans* Golgi el cual, separa las proteínas en diferentes vesículas dependiendo de su destino. Una vez en los gránulos de secreción el péptido C es removido de la proinsulina generando la insulina.

Un par de aminoácidos dibásicos (Arg31 y Arg32) que unen al péptido C con la cadena B y otro par (Lys64 y Arg 65) que une al péptido C con la cadena A, son esenciales en el procesamiento proteolítico de la proinsulina a insulina dentro de los gránulos de secreción (Baillyes y col., 1992).



**Figura 2. Estructura de la preinsulina humana.** Muestra el péptido señal, las cadenas A y B, el péptido C, los puentes disulfuro (barras negras) y los aminoácidos (aa) dibásicos importantes en la remoción del péptido C.

### 3.3 EL ACOPLAMIENTO ENTRE LA ESTIMULACIÓN CON GLUCOSA Y LA SECRECIÓN DE INSULINA

#### 3.3.1 Transporte y metabolismo de la glucosa en las células $\beta$ pancreáticas

El transporte de glucosa a la célula  $\beta$  ocurre por difusión facilitada por medio del transportador GLUT2, el cual no depende de insulina. Este tipo de transportadores se expresan en hepatocitos, células  $\beta$ , células del intestino delgado y en el riñón (Shepherd y Kahn, 1999).

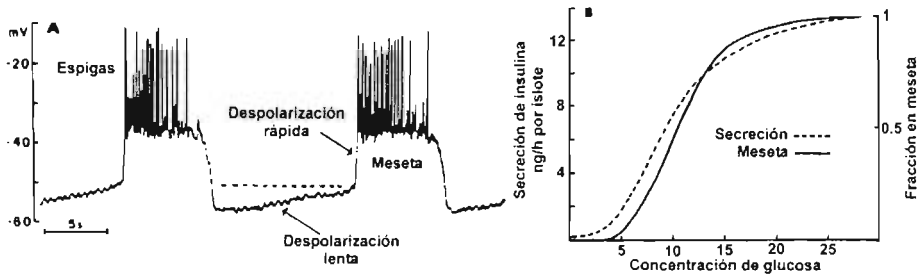
En el interior de la célula, la glucosa es fosforilada a glucosa-6-fosfato por la glucocinasa, que es el primer paso de la glucólisis, posteriormente es oxidada por otras enzimas hasta formar dos moléculas de piruvato. Este último es convertido a acetil-coenzima A en la mitocondria, en donde entra al ciclo de Krebs y es oxidado. La última fase es la transferencia de electrones y la fosforilación oxidativa, dando como resultado la síntesis de ATP (Lehninger, 1995). El incremento en la relación de ATP/ADP en la célula  $\beta$ , inicia la actividad eléctrica que se describe a continuación.

### **3.3.2 La secreción de insulina es regulada por la actividad eléctrica de la célula $\beta$ pancreática**

La actividad eléctrica de las células  $\beta$  tiene un papel esencial en la regulación de la secreción de insulina. Cuando la concentración de glucosa extracelular está en el nivel basal, es decir alrededor de 5.0 mM, la célula  $\beta$  se encuentra polarizada oscilando a un potencial de reposo de cerca de -70 mV. Si la concentración extracelular de glucosa aumenta por arriba de 7.5 mM, se observa una despolarización lenta de la membrana, seguida por una despolarización rápida, hasta un potencial de meseta ( $\approx$  -35 mV) en el que se superponen trenes de potenciales de acción, después de lo cual se repolariza la membrana debido a la apertura del canal KATP, a consecuencia de la disminución en la relación ATP/ADP.

Mientras la concentración de glucosa permanezca elevada la membrana se volverá a despolarizar repitiéndose la cadena de fenómenos descritos (Figura 3). Existe una estrecha correlación entre el tiempo que la célula permanece en meseta disparando potenciales de acción y la secreción de insulina. Ambos procesos dependen de la concentración de glucosa extracelular (Ozawa y Sand, 1986).



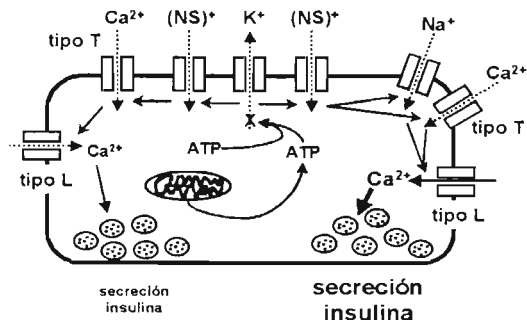


**Figura 3.** (A) Actividad eléctrica de la célula  $\beta$  registrada con microelectrodos en el islote pancreático del ratón. (B) Correlación entre el tiempo que la célula permanece en meseta y la cantidad de insulina secretada (Modificado de Ozawa y Sand, 1986).

### 3.3.3 Canales iónicos que participan en la actividad eléctrica estimulada por glucosa de las células $\beta$ pancreáticas

La actividad eléctrica de las células  $\beta$  pancreáticas se debe a la actividad de canales de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  y a canales catiónicos no selectivos (Rosario y col., 1993; Mears, 2004; Smith y col., 1993; Hiriart y Matteson, 1988; Vidaltamayo y col., 2002; Cook y col., 1988; Roe y col 1996; MacDonald y col., 2001 y 2002) (Figura 4)

La secreción de insulina es estimulada por un aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, el cual es resultado de la activación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje. Por medio de estudios electrofisiológicos y de biología molecular se han identificado distintos tipos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula  $\beta$ : los tipo L, los T y los N (Hiriart y Matteson, 1988; Mears, 2004; Smith y col., 1993), pero al parecer los más importantes en el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  y en la secreción de insulina son los tipo L (Misler y col., 1992a), ya que los potenciales de acción de estas células son inhibidos por nifedipina, un bloqueador de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L (Rosario y col., 1993).



**Figura 4.** Modelo que esquematiza los diferentes tipos de canales iónicos involucrados en la actividad eléctrica y en la secreción de insulina de la célula  $\beta$  pancreática de rata. Canales catiónicos no selectivos (NS) (Modificado de Vidaltamayo y col., 2002).

La contribución de los canales de  $Na^{+}$  en la actividad eléctrica de la célula  $\beta$  es motivo de controversia, ya que en el ratón estos canales no participan en el disparo de potenciales de acción (Misler y col., 1992a), mientras que en la rata (Hiriart y Matteson, 1988; Vidaltamayo y col., 2002) y el humano (Misler y col., 1992b), se ha demostrado que la activación de la corriente de  $Na^{+}$  es importante en la despolarización inducida por glucosa.

En este sentido es importante mencionar que la tetrodotoxina inhibe la actividad eléctrica de la célula  $\beta$  pancreática de rata, al bloquear los canales de  $Na^{+}$  dependientes de voltaje (Dunne y col., 1990; Pressel y Misler, 1991; Vidaltamayo y col., 2002). Asimismo, la TTX disminuye la secreción de insulina estimulada por glucosa (a concentraciones por arriba de 10 mM), que en condiciones normales, produciría el disparo de potenciales de acción (Hiriart y Matteson, 1988).

Los canales de  $K^{+}$  sensibles a ATP (KATP) son importantes en el mantenimiento del potencial de reposo de la célula  $\beta$ , ya que en condiciones normales existe una permeabilidad catiónica no selectiva (ver más adelante) que es cancelada por la

corriente de  $K^+$  sensible a ATP. Cuando aumenta la concentración extracelular de glucosa, incrementa la relación ATP/ADP provocando el cierre de canales KATP. De esta forma, el flujo de corriente a través de los canales catiónicos no selectivos produce una despolarización lenta, hasta alcanzar un nivel de potencial de membrana al cual aumenta la probabilidad de apertura de canales de  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  sensibles al voltaje (Cook y col., 1988).

La repolarización de las espigas durante la actividad eléctrica de las células  $\beta$  se debe a la apertura de canales de  $K^+$  dependientes de voltaje (Kv1 y Kv2) y canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$ ,  $K_{Ca}$  (Roe y col 1996, MacDonald y col., 2001 y 2002; Gopel y col., 1999), los cuales repolarizan la membrana hasta el potencial de meseta. Estos canales incrementan su permeabilidad a voltajes despolarizantes y se cierran a voltajes cercanos al potencial de meseta, mientras que los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje permanecen abiertos durante la fase de meseta y por lo tanto el decremento en la actividad de los canales Kv y  $K_{Ca}$  produce una corriente entrante neta de  $Ca^{2+}$ , que despolariza la membrana e induce otro potencial de acción (Figura 3) (Ashcroft y Ashcroft, 1992).

La repolarización de la fase de meseta se debe principalmente a la hiperpolarización de la célula producida por la apertura del canal KATP, debido a la disminución en la relación ATP/ADP (Ding y col., 1996), pero si la concentración de glucosa permanece elevada la membrana se volverá a despolarizar repitiéndose la cadena de fenómenos antes descritos.

### **3.3.4 La corriente catiónica no selectiva**

La despolarización lenta producida por el cierre de los canales KATP es un evento muy importante el cual no ha sido estudiado en detalle, pero es posible que se deba a una entrada de  $Na^+$  a través de canales catiónicos no selectivos ya que la sustitución de este catión en el medio extracelular la inhibe (Henquin et al., 1988, de Miguel y col., 1988). Se sugiere que este evento no depende de la actividad de

canales  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje ya estos incrementan su probabilidad de apertura a potenciales cercanos a  $-40$  mV, lejos del potencial al cual inicia la despolarización lenta ( $-70$  mV).

La corriente catiónica no selectiva fue descrita por primera vez en células secretoras de insulina (en la línea celular CRI G1) por Sturgess en 1986. Esta corriente es activada a concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular mayores a  $100 \mu\text{M}$  y presenta una ligera rectificación. Otros grupos han descrito la presencia de una corriente similar en células  $\beta$  pancreáticas de rata (Liu y col., 1997) y en células de insulinoma HIT-T15 y  $\beta\text{TC3}$  (Leech y col., 1995, Roe y Col., 1998).

Alternativamente se ha demostrado que agentes que incrementan la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, como la taspigargina, o la activación de proteínas  $G_q$  acopladas a la vía de señalización de fosfatidil inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) activan corrientes catiónicas no selectivas, en una gran variedad de células, entre las que destacan: células de insulinoma de ratón  $\beta\text{TC3}$  (Roe et al., 1998). Esta corriente ha sido llamada corriente catiónica no selectiva activada por la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $I_{\text{CRAN}}$ ) y también puede ser activada por maitotoxina, una toxina aislada del dinoflagelado *Gambierdiscus toxicus*, que en células  $\beta$  incrementa la secreción de insulina, la producción de  $\text{IP}_3$  y el influjo de cationes (Soergel y col., 1990; Murata y col., 1992).

Se sabe que la maitotoxina induce una despolarización de la membrana plasmática en células  $\beta$  de ratón como resultado de un incremento en la permeabilidad a  $\text{Na}^+$ , de manera similar al efecto que se produce cuando la concentración de glucosa alcanza concentraciones estimulantes (Worley et al., 1994).

### 3.3.5 Los canales operados por almacenes (SOC)

Los canales activados por el vaciamiento de depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares han sido nombrados SOC (Canales Operados por Almacenes) los cuales, son activados por el vaciamiento de depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ . Estos canales son permeables principalmente a  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ . La identidad de los canales SOC no ha sido bien definida, pero se sugiere que pertenecen a la familia de canales TRP (ver más adelante). Los mecanismos mediante los cuales el vaciamiento de los depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  los activa no es claro, pero se han propuesto tres hipótesis para explicar este fenómeno:

1. *Mensajero difusible*, sugiere que los depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular liberan un mensajero que activa a un receptor en la membrana plasmática, el cual podría ser el propio canal (Randriamampita y Tsien, 1993).
2. *Acoplamiento físico* directo entre el sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos y los SOC (Irvine, 1990, Boddington y col., 2002).
3. *Mediador vesicular*, considera que el incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular promueve la incorporación de nuevos canales SOC a la membrana plasmática mediante la fusión de vesículas (Patterson y col., 1999; Ma y col., 2000; Scott y col., 2003).

### 3.3.6 Canales TRP

Los canales TRP son canales catiónicos no selectivos que inicialmente se asociaron a células no excitables, de ahí las siglas TRP, las cuales significan: "potencial de receptor transitorio". Estas células no excitables no son capaces de producir potenciales de acción debido a la carencia de canales de sodio y/o de calcio sensibles a voltaje. En su lugar, producen potenciales de receptor, los cuales son despolarizaciones moderadas inducidas por diversos tipos de canales catiónicos presentes en la membrana plasmática de estas células (Montell, 2001).

Actualmente se sabe que los canales TRP están distribuidos en una gran variedad de tipos celulares, entre los que destacan, las células  $\beta$  pancreáticas de ratón y rata (Vaca y col, datos no publicados) y células secretoras de insulina  $\beta$ TC3 (Qian y col., 2002) y MIN6 (Sakura y Ashcroft, 1997).

La familia de canales TRP está compuesta de tres subfamilias: TRPC (Vázquez y col., 2004) activados por el vaciamiento de depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  (Putney y McKay, 1999, Bakowski y col., 2003) y por diacilglicerol (Hofmann y col., 1999, Chyb y col., 1999); TRPV, activados por cambios de volumen celular, por incremento de la temperatura y por vanilooides tales como la capsaicina (Caterina y col., 1997; Caterina y Montell, 2005; Mutai y S  ller, 2003; Benham y col., 2003; Benham y col., 2002; Gunthorpe y col., 2002) y TRPM, activados por mentol (Fleig y Penner, 2004), estrés oxidativo (Perraud y col., 2005), por eritrosfingosina (Grimm y col., 2005), al frío (Story y col., 2003) por  $\text{Ca}^{2+}$  (Hofmann y col., 2003, Prawitt y col., 2003).

Se ha demostrado que las células  $\beta$  pancreáticas de ratón expresan el gen TRPC1 y/o el TRP4 (Roe et al, 1998; Sakura and Ashcroft, 1997) los cuales, se ha sugerido que son canales catiónicos no selectivos operados por almacenes de  $\text{Ca}^{2+}$  (SOCs). Sin embargo no es clara la participación de los TRPC1 y TRPC4 como SOCs en las células  $\beta$ , ya que la sobreexpresión de éstos en células  $\beta$ TC3 no produce corrientes activadas por el vaciamiento de los depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  (Quian et al., 2002).

### **3.3.7 Depósitos intracelulares de $\text{Ca}^{2+}$**

Los depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  son retículo endoplásmico, mitocondria y núcleo juegan un papel muy importante en la fisiología celular, ya que junto con las bombas de  $\text{Ca}^{2+}$ , mantienen la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico en niveles óptimos para el funcionamiento adecuado de las células (1-100 nM). La capacidad de almacenaje en dichos depósitos, depende en gran medida de la concentración

de proteínas de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  como la calsequestrina (en músculo) y la calreticulina (en otros tipos celulares).

Uno de los mecanismos que desencadenan la liberación de calcio de depósitos intracelulares es la unión de transmisores como acetilcolina a receptores muscarínicos en la membrana plasmática de células  $\beta$  pancreáticas. Esta unión activa a la fosfolipasa C, la cual cataliza la producción de  $\text{IP}_3$ , un segundo mensajero capaz de inducir la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  al unirse a su receptor ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) en la membrana del retículo endoplásmico (Blondel y col., 1993; Lee y Laychock, 2001; Dyachok y col., 2004)

Otro mecanismo que puede desencadenar la liberación de calcio del retículo endoplásmico de células  $\beta$ , es la activación de receptores a ryanodina. Estos receptores pueden ser activados por segundos mensajeros entre los que destaca el propio  $\text{Ca}^{2+}$  (Johnson y col., 2004) y la ADP ribosa cíclica (cADPR).

La recaptura de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el retículo endoplásmico es mediada por la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico (SERCA), la cual bombea  $\text{Ca}^{2+}$  en contra de su gradiente de concentración (Varadi y col., 1995; Xu y col., 2000; Chen y col., 2003; Kulkarni y col., 2004)

Se ha descrito que la glucosa ( $> 7$  mM) además de producir una despolarización de la membrana plasmática de células  $\beta$  pancreáticas, induce oscilaciones intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  (Roe y col., 1993, Rojas y col., 1994, Gromada y col., 1996), mediante la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico. Estas oscilaciones presentan dos componentes, uno rápido, en el cual incrementa la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al retículo endoplásmico, y que coincide con el incremento en la actividad eléctrica de las células  $\beta$ , y uno lento, que promueve la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de depósitos intracelulares.

Además de la glucosa, el  $IP_3$ , y el  $Ca^{2+}$ , existen otros agentes que inducen un incremento en la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$ , uno de ellos es la tapsigargina (Thastrup y col., 1990). Este fármaco, aislada de la planta *Thapsia garganica*, ha sido empleada como herramienta para el estudio de los mecanismos de señalización de  $Ca^{2+}$  intracelular debido a que bloquea a la SERCA, generando una elevación de la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular.

Si bien la tapsigargina no es un agente endógeno de células animales, inhibe específicamente la SERCA del retículo endoplásmico y por esta razón es una herramienta farmacológica de gran utilidad en estudios de movilización intracelular de  $Ca^{2+}$ . La tapsigargina posee una constante de inhibición ( $K_i$ ) por la SERCA de 1.44 nM pero su unión es irreversible.

En células  $\beta$  pancreáticas de ratón, la tapsigargina además de promover el vaciado de los depósitos intracelulares de  $Ca^{2+}$ , induce la entrada de  $Ca^{2+}$  a la célula, a través de un mecanismo que no implica la inhibición del KATP, ya que la tolbutamida (un inhibidor de canales KATP) no bloquea el incremento en la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular (Miura y col., 1997). La elevación del  $Ca^{2+}$  (Liu y Gylfe, 1997) no involucra la activación de canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje, ya que el bloqueo de estos canales no tiene efecto sobre el incremento en la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$ .



## IV PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Varios grupos sugieren que la corriente catiónica no selectiva de las células  $\beta$  pancreáticas es muy importante en el inicio de la actividad eléctrica después del cierre de canales KATP, ya que despolariza la membrana plasmática hasta el potencial al cual, incrementa la probabilidad de apertura de los canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles al voltaje. Esta corriente puede ser activada por agonistas muscarínicos o por el vaciamiento de depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ .

En nuestro laboratorio hemos observado que la tapsigargina, que bloquea la recaptura de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia retículo endoplásmico y por consiguiente incrementa la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , induce la secreción de insulina. Por esta razón, en el presente trabajo se analizó el efecto de la tapsigargina sobre la corriente catiónica y su relevancia en la secreción de insulina de células  $\beta$  pancreáticas aisladas.

## V HIPÓTESIS

La tapsigargina activa una corriente catiónica que despolariza la célula e induce la actividad eléctrica y en consecuencia, promueve la secreción de insulina en células  $\beta$  pancreáticas aisladas.

## VI OBJETIVOS

### General

Analizar los efectos de la tapsigargina sobre la corriente catiónica de las células  $\beta$  pancreáticas y la secreción de insulina

### Particulares

1. Caracterizar la corriente catiónica inducida por tapsigargina en la célula  $\beta$  pancreática.
2. Analizar el efecto de la tapsigargina sobre la secreción de insulina.

## VII MATERIAL Y MÉTODOS

### 7.1 CULTIVOS DE CÉLULAS $\beta$ PANCREÁTICAS

Se realizaron cultivos primarios de células  $\beta$  pancreáticas con la técnica descrita previamente por Hiriart y Ramírez Medeles en 1991.

Se utilizaron ratas Wistar machos de 250 a 280 g de peso, a las cuales se les extrajo el páncreas. Estos fueron digeridos en colagenasa tipo IV (1 mg/ml de tejido), para separar los islotes del tejido acinar. Los islotes fueron aislados por medio de un gradiente de ficoll y lavados con solución salina balanceada de Hanks (HBSS) con albúmina sérica bovina (BSA; 0.1 mg/ml) y gentamicina (5  $\mu$ g/ml).

Para la obtención de las células  $\beta$  pancreáticas aisladas, los islotes fueron disgregados con solución dispersante HBSS sin  $\text{Ca}^{2+}$ , con 0.5 mg/ml de BSA, penicilina 200 U/ml, estreptomycin 200  $\mu$ g/ml y glucosa 15 mM durante 10 minutos, a 37°C en agitación constante. Posteriormente, las células se dispersaron con ayuda de una pipeta Pasteur siliconizada.

Las células aisladas se sembraron y cultivaron en cajas Petri con medio de cultivo RPMI-1640 con penicilina 200 U/ml, estreptomycin 200  $\mu$ g/ml, fungizona 0.5  $\mu$ g/ml, glutamina 2 mM y 10% de suero bovino fetal, a 37°C con una mezcla de 5 % de  $\text{CO}_2$  en aire. Para medir el efecto de la tapsigargina sobre las corrientes totales, las células  $\beta$  se cultivaron durante 1 a 3 días, y para determinar los efectos de la tapsigargina sobre la secreción de insulina el cultivo fue de 48 h.

## **7.2 REGISTRO DE LA CORRIENTE CATIÓNICA MEDIANTE LA TÉCNICA DE CONTROL DE VOLTAJE**

Se realizaron registros de corrientes totales mediante la técnica de control de voltaje en microáreas de membrana (patch-clamp) en su modalidad de célula entera. Esta metodología consiste en formar un sello de alta resistencia ( $G\Omega$ ) entre un microelectrodo y la membrana celular. Una vez realizado el sello, mediante un pulso de succión, se rompe el área de membrana que subyace a la punta del microelectrodo, permitiendo registrar la corriente macroscópica de la célula (Neher y Sakmann, 1992).

Para los registros de la corriente macroscópica, se utilizaron electrodos de vidrio (Kimax 5.1) de 1.5 mm, con resistencia de 1.5 a 2.5  $M\Omega$ , los cuales fueron cubiertos con una capa de aislante Sylgard para reducir su capacitancia. Los electrodos fueron llenados con las soluciones internas SI1 o SI2 enlistada en la tabla I. Además se utilizaron 5 soluciones externas distintas, con la finalidad de conocer la permeabilidad a  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  por los canales catiónicos. Estas soluciones se muestran en la tabla II.

La SI1 empleada inicialmente en los registros tenía BAPTA, pero debido a que este quela con mayor rapidez el  $Ca^{2+}$ , decidimos utilizar un quelante con menor actividad y por esta razón decidimos sustituirlo por EGTA (SI2).

Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (20–22 °C). La tapsigargina (200 nM) se aplicó por perfusión a presión sobre la célula de registro, con ayuda de un sistema de inyección de alta presión (picospritzer, General valve). El efecto de la tapsigargina se midió inmediatamente después de haber sido aplicada.

	SI 1 (mM)	SI 2 (mM)
CsAsp	115	115
CsCl	10	10
CsF	10	10
BAPTA	5	—
EGTA	—	2.5
HEPES	10	10
ATP	10	10

**Tabla I. Soluciones internas para el registro de corrientes totales.** Los valores están expresados en milimolas/l (mM). En todos los casos, el pH fue de 7.3 y la osmolaridad de 290 miliosmoles/kg (mOsm/kg). Solución interna, (SI); Aspartato de cesio, (CsAsp).

	SE 1 (mM)	SE 2 (mM)	SE 3 (mM)	SE 4 (mM)	SE 5 (mM)
NaCl	125	115	130	—	—
NMDG	—	—	—	115	130
KCl	5	5	5	5	5
CaCl <sub>2</sub>	2.5	10	0.1	10	0.1
HEPES	10	10	10	10	10
Glucosa	10	10	10	10	10

**Tabla II. Soluciones externas para el registro de corrientes totales.** Los valores están expresados en milimolas/l (mM). En todos los casos, el pH fue de 7.4 y la osmolaridad de 290 miliosmoles/kg (mOsm/kg). Solución externa, (SE); N-metil D-glucamina, (NMDG).

El registro de fijación de voltaje, se llevó a cabo con ayuda de un amplificador Axopatch 200 A (Axon Instruments) conectado a una computadora PC por medio de una tarjeta Digidata 1322A (Axon instruments). Para diseccionar la corriente catiónica inducida por tapsigargina se realizaron protocolos de pulsos cuadrados de -120 mV a 60 mV con incrementos de 20 mV, a un potencial de mantenimiento de -80 mV. La duración de cada pulso fue de 250 ms. Para la generación de pulsos y la adquisición de los datos se utilizó el programa pClamp 8.0 (Axon Instruments).

La conductancia ( $g$ ) de la corriente macroscópica se calculó utilizando la ecuación 1:

$$g = I_2 - I_1 / V_2 - V_1$$

donde  $I_1$  es la corriente al potencial de mantenimiento ( $V_1$ ) e  $I_2$  es la corriente a -100 mV ( $V_2$ )

El análisis de los datos se realizó con el programa Clampfit 8.1 (Axon instruments). Los datos se evaluaron con una prueba de análisis de varianza (ANOVA) de dos colas, seguido por una prueba de Fisher, utilizando el programa Stat View 4.53.

### **7.3 MEDIDA DE LA SECRECIÓN DE INSULINA**

El análisis de la secreción de insulina de células  $\beta$  aisladas se realizó mediante la técnica de Ensayo Hemolítico Inverso (RHPA) que se basa en el fenómeno de hemólisis mediada por complemento en presencia de un complejo antígeno anticuerpo (Figura 5) (Nelly y Frawley, 1983). Esta metodología nos permite identificar las células secretoras de insulina y medir la secreción de células  $\beta$  aisladas.

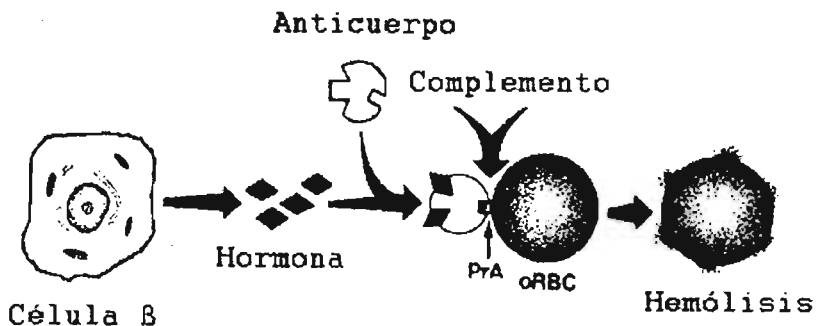


Figura 5. Esquema del Ensayo Hemolítico Inverso (RHPA)

### 7.3.1 Marcaje de los eritrocitos

Los eritrocitos de carnero fueron conjugados con proteína A de *Staphylococcus aureus* con el propósito de unir anticuerpos contra insulina a su membrana. Para ello, a los eritrocitos previamente lavados con solución salina 0.9 % se les agregó la proteína A (0.5 mg/ml) y  $\text{CrCl}_3$  (0.2 mg/ml). Esta mezcla se incubó durante 1 hora a  $37^\circ\text{C}$  y posteriormente, los eritrocitos marcados se lavaron varias veces y se almacenaron en RPMI 1640 con 0.1 % BSA.

### 7.3.2 Cámaras de Cunningham

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

### **7.3.3 Ensayo Hemolítico Inverso (RHPA)**

Para los experimentos de RHPA, se realizó una mezcla de eritrocitos de carnero marcados con proteína A y células  $\beta$ , la cual se colocó en cámaras de Cunningham cubiertas con poli-L-lisina. Esta mezcla se incubó durante 1 h a 37 °C para asegurar que las células se pegaran a la base de la cámara. Posteriormente, la monocapa celular se incubó durante 1 h a 37 °C, en HBBS con 5.6 o 15.6 mM glucosa en condiciones testigo, con tapsigargina (200 nM) o con tapsigargina y nifedipina (5  $\mu$ M), en presencia de un anticuerpo contra insulina (1:20). Al término de esta incubación, se adicionó el complemento (1:20) por un periodo de 30 min. Al finalizar el RHPA las células se fijaron con glutaraldehído 0.2 % y se almacenaron en solución salina (NaCl 0.9 %).

### **7.3.4 Análisis de la secreción**

La insulina secretada durante la incubación con los diferentes tratamientos produjo placas de hemólisis (inmunoplasmas), las cuales se observaron con ayuda de un microscopio invertido conectado a un sistema de video (TM-90PSN, JVC). El diámetro de cada placa se midió directamente en el monitor del sistema de video y su tamaño se expresó en  $\mu\text{m}^2$ .

Se contó el número de células formadoras de placa y se expresó como porcentaje. El índice de secreción se calculó multiplicando el área promedio de las inmunoplasmas por el porcentaje de células secretoras, y se expresó en unidades arbitrarias. Todos los experimentos fueron hechos por duplicado.

Los datos se evaluaron con una prueba de análisis de varianza (ANOVA) de dos colas, seguido por una prueba de Fisher, utilizando el programa Stat View 4.53.



## VIII RESULTADOS

### **8.1 DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE REGISTRO**

Inicialmente se realizaron experimentos en los cuales se empleó BAPTA (5 mM) como quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  en la solución interna de registro (SI1) y en presencia de 2.5 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (SE1). En estas condiciones, la aplicación de tapsigargina (TG) 200 nM no produjo cambios ni en la amplitud, ni en la cinética de la corriente con respecto a su control (datos no mostrados).

La concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en presencia de 5 mM de BAPTA inhibió la corriente catiónica, probablemente porque la activación de esta corriente requiere de una mayor concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular libre. Por esta razón, decidimos sustituir BAPTA por EGTA y reducir la concentración intracelular de quelante.

Así mismo, aumentamos la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular de 2.5 a 10 mM, para aumentar la fuerza impulsora del  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el interior de la célula.

### **8.2 EFECTO DE LA TAPSIGARGINA SOBRE LAS CORRIENTES TOTALES DE CÉLULAS $\beta$ PANCREÁTICAS**

La figura 6A, muestra familias de corrientes generadas por pulsos de voltaje desde -120 mV hasta 60 mV en incrementos de 20 mV, desde un potencial de mantenimiento de -80 mV en condiciones testigo (en ausencia de TG) y después de la aplicación de TG en presencia de la solución externa 2 (SE2) y la solución interna 2 (SI2) (ver tablas I y II).

En condiciones testigo se puede apreciar que existe una corriente entrante, la cual se observa desde el inicio del protocolo, y no se inactiva a lo largo del pulso (250 ms). La aplicación de TG activó una corriente catiónica entrante con cinética

similar a la de los registros testigo pero de mayor amplitud. Al igual que la corriente testigo se observa desde el inicio del protocolo y presenta una fase sostenida a lo largo del pulso.

En la relación corriente a voltaje (IV) de la Figura 6B se observa que a -100 mV, la TG incrementó la amplitud de la corriente entrante de 13 pA a 34 pA, 2.6 veces más que la de los registros testigo. En estas condiciones, no existen diferencias en la corriente saliente después de la aplicación de TG. El potencial de inversión de la corriente testigo fue de aproximadamente -10 mV y no se modificó en presencia de TG. En la curva IV se observa que la corriente presenta una rectificación saliente, en la cual se presenta una mayor permeabilidad a  $\text{Cs}^+$  hacia el medio extracelular.

La conductancia de la corriente macroscópica para estos experimentos fue de 20 pS/pF para el testigo y de 33 pS/pF después de la aplicación de TG, si consideramos que la capacitancia de la célula es de 8.4 pF. Estos resultados muestran, que la TG incrementa una corriente entrante que no es sensible al voltaje.

### **8.3 SELECTIVIDAD DE LA CORRIENTE**

Para explorar la selectividad de los canales a distintos cationes, se redujo la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  de 10 mM a 100  $\mu\text{M}$  en la SE 3.

En estas condiciones (SE2 y SI2) se puede apreciar que la TG aumenta la corriente entrante, aún en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (Figura 7).

La figura 7A, muestra las familias de corrientes generadas con los pulsos de voltaje arriba descritos, tanto en condiciones testigo como después de la aplicación de tapsigargina 200 mM. Al igual que en presencia de  $\text{Na}^+$  normal y alto  $\text{Ca}^{2+}$  (10 mM), se puede apreciar que en condiciones testigo existe una corriente

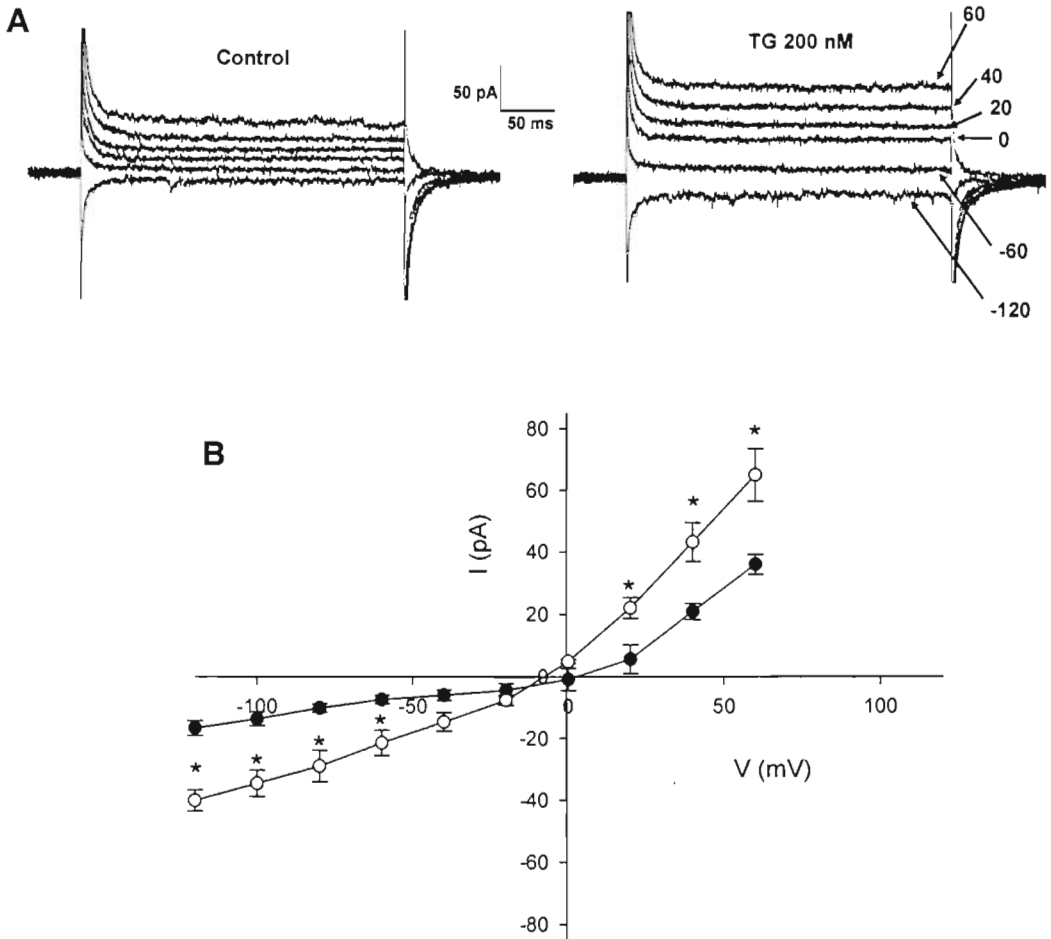


Figura 6. Efecto de la tapsigargina sobre las corrientes macroscópicas en la célula  $\beta$  pancreática. (A) Familias de corrientes macroscópicas durante pulsos de 250 ms a los voltajes indicados en mV, desde un potencial de mantenimiento de -80 mV antes y después de la aplicación de TG. Los registros se llevaron a cabo con las SE y SI2. (B) Relación corriente a voltaje, de células registradas en ausencia y presencia de TG. Los datos se graficaron como el promedio ( $\bar{X}$ )  $\pm$  el error estándar del promedio (ES) de 9 células. Círculos negros testigo, círculos blancos TG 200 nM. V (voltaje), I (corriente).

entrante desde el inicio del protocolo que no se inactiva a lo largo del pulso. La aplicación de TG activó una corriente similar a la testigo pero de mayor amplitud, esta corriente se observó desde el inicio del protocolo y tampoco se inactivó durante el pulso.

La relación IV (Figura 7B) mostró que a -100 mV la TG incrementó la amplitud de la corriente entrante de 9 pA a 27 pA, 2.8 veces más que en condiciones testigo. El potencial de inversión en ambas condiciones fue de aproximadamente -17 mV y no se modificó en presencia de TG. Al igual que en los otros casos, se observa que la corriente presenta una ligera rectificación saliente.

La conductancia de la corriente macroscópica obtenida usando la ecuación 1 en estas condiciones fue de 12 pS/pF para el testigo y de 40 pS/pF después de la aplicación de TG.

La sustitución de  $\text{Ca}^{2+}$  en la solución extracelular, muestran que la TG incrementa una corriente entrante, lo cual nos indica que el canal activado por TG es poco permeable al  $\text{Ca}^{2+}$ .

Al disminuir la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular no logramos eliminar por completo la corriente activada por tapsigargina. Nuestro siguiente objetivo fue sustituir el  $\text{Na}^+$  en la solución extracelular por NMDG manteniendo la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  elevada (SE4), con el fin de conocer la proporción de la corriente que es portada por  $\text{Na}^+$ . El NMDG no permea a través de los canales ya que es un catión muy grande.

La figura 8A muestra familias de corrientes, generadas por pulsos de voltaje desde -120 mV hasta 60 mV en incrementos de 20 mV, desde un potencial de mantenimiento de -80 mV en condiciones testigo y después de la aplicación de TG 200 nM. En condiciones testigo se puede apreciar que existe una corriente entrante, presente desde el inicio del protocolo, la cual no se inactiva a lo largo del

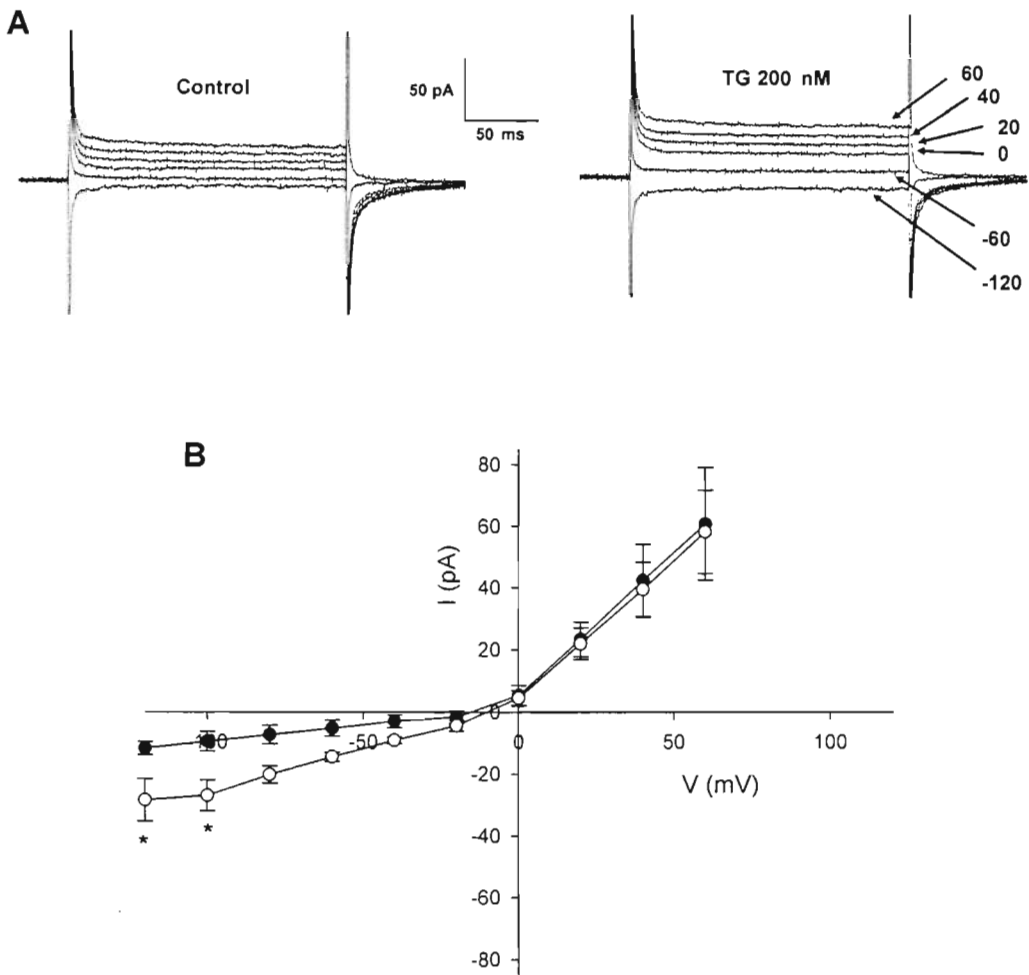


Figura 7. Efecto de la tapsigargina sobre las corrientes macroscópicas de células  $\beta$  en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. (A) Registros representativos de las corrientes macroscópicas de una célula  $\beta$  durante pulsos de 250 ms a los voltajes indicados en mV, desde un potencial de mantenimiento de  $-80$  mV antes y después de la aplicación de TG. Los registros se llevaron a cabo con las SE3 y SI2. (B) Relación corriente a voltaje, de células registradas en ausencia y presencia de TG. Los datos se graficaron como el  $\bar{X} \pm \text{ES}$  de 4 células. Círculos negros testigo, círculos blancos TG 200 nM. V (voltaje), I (corriente).

pulso. En estas condiciones, la aplicación de TG produjo un ligero incremento en la amplitud de la corriente el cual, no fue significativo con respecto a las corrientes testigo. La cinética de la corriente en presencia de TG presenta una fase sostenida a lo largo del pulso es similar a la de los registros testigo.

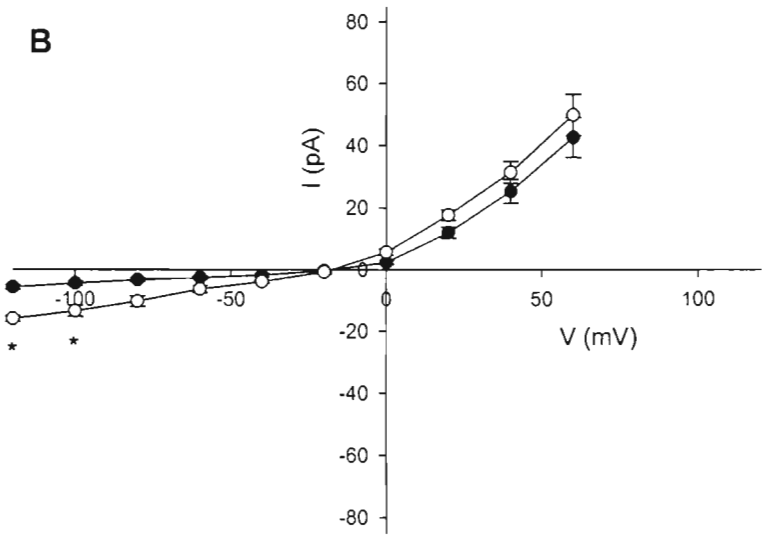
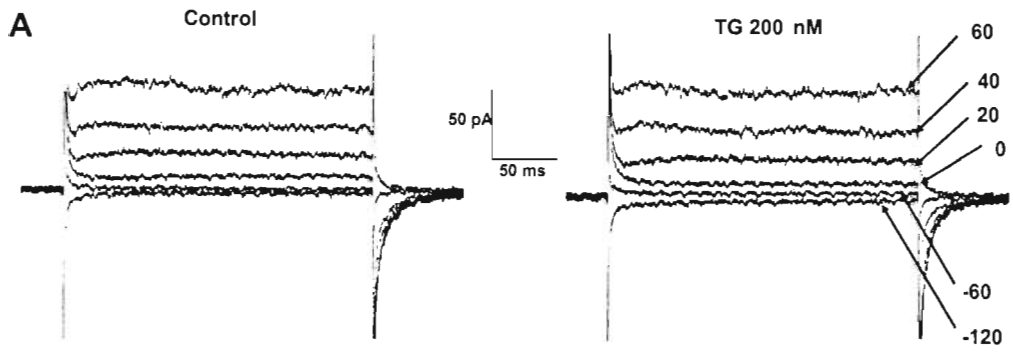
En la relación IV (Figura 8B) se observa que a -100 mV, la TG incrementó la amplitud de la corriente entrante de 4.4 pA a 13.4 pA, 3 veces más que la de los registros testigo. En estas condiciones, no existen diferencias en la corriente saliente después de la aplicación de TG. El potencial de inversión de la corriente testigo fue de aproximadamente -10 mV y no se modificó en presencia de TG. En la curva IV se observa que la corriente presenta una rectificación saliente, en la cual se presenta una mayor permeabilidad a  $\text{Cs}^+$  hacia el medio extracelular.

La conductancia de la corriente macroscópica en estas condiciones es 6.6 pS/pF para el registro testigo y 18 pS/pF después de la aplicación de la TG, considerando que la capacitancia de la célula es de 8.4 pF, la cual es la capacitancia promedio de las células registradas en nuestro laboratorio.

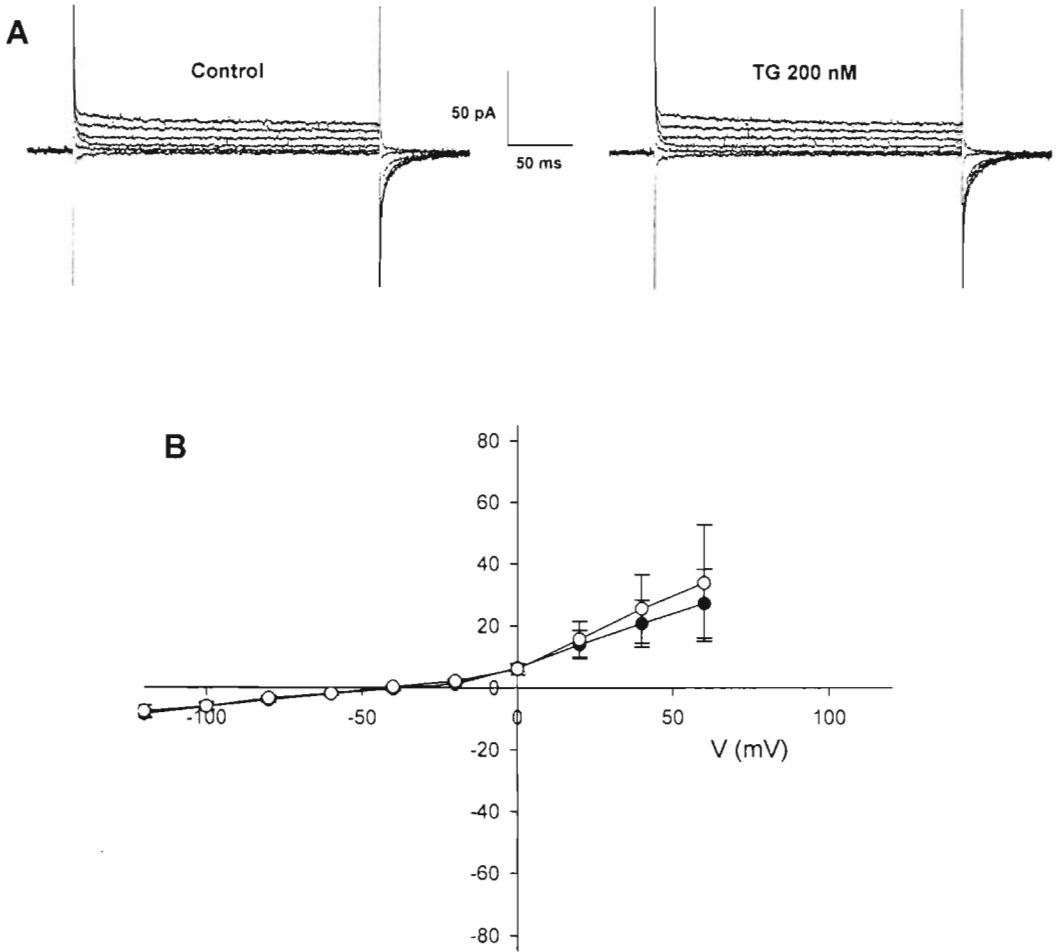
La sustitución de  $\text{Na}^+$  por NMDG sugiere que la corriente activada por TG es portada principalmente por  $\text{Na}^+$ .

Posteriormente se sustituyó el  $\text{Na}^+$  por NMDG al mismo tiempo que se redujo la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  a 100  $\mu\text{M}$  en la solución extracelular (SE5). En estas condiciones, la amplitud de la corriente se redujo sustancialmente.

La figura 9A muestra familias de corrientes generadas por pulsos de voltaje desde -120 hasta 60 mV en incrementos de 20 mV, desde un potencial de mantenimiento de -80 mV, en condiciones testigo y después de la aplicación de TG 200 nM. Los registros representativos de estos experimentos muestran que la TG no produjo cambios ni en la amplitud ni en la cinética de la corriente con respecto a los registros testigo.



**Figura 8. Efecto de la taspigargina sobre las corrientes macroscópicas de células  $\beta$  en ausencia de  $\text{Na}^+$  extracelular.** (A) Familias de corrientes macroscópicas durante pulsos de 250 ms a los voltajes indicados en mV, desde un potencial de mantenimiento de  $-80$  mV, antes y después de la aplicación de TG. Los registros se llevaron a cabo con las SE4 y SI2. (B) Relación corriente a voltaje de células registradas en ausencia y presencia de TG. Los datos se graficaron como el  $X \pm \text{ES}$  de 7 células. Círculos negros testigo, círculos blancos TG 200 nM. V (voltaje), I (corriente).



**Figura 9. Efecto de la tapsigargina sobre las corrientes macroscópicas en la célula  $\beta$  pancreática en ausencia de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ .** (A) Registros representativos de las corrientes macroscópicas de una célula  $\beta$  durante pulsos de 250 ms a los voltajes indicados en mV, desde un potencial de mantenimiento de  $-80$  mV antes y después de la aplicación de TG. Los registros se llevaron a cabo con las SE5 y S12. (B) Relación corriente de células registradas en ausencia y presencia de TG. Los datos se graficaron como el promedio ( $\bar{X}$ )  $\pm$  la desviación estándar del promedio (ES) de 4 células. Círculos negros testigo, círculos blancos TG 200 nM. V (voltaje), I (corriente).



De igual forma la relación IV (Figura 9B) muestra que la tãpsigargina no produjo cambios en la amplitud de la corriente, con respecto a su testigo. El potencial de inversión en estas condiciones fue cercano a los  $-40$  mV antes y después de la aplicación de TG.

La figura 10 muestra que la corriente activada por TG disminuye aproximadamente el 65 % cuando el  $\text{Na}^+$  es remplazado por NMDG en la solución externa (SE3), comparada con la activada por TG en presencia de  $\text{Na}^+$  en el medio extracelular (SE2).

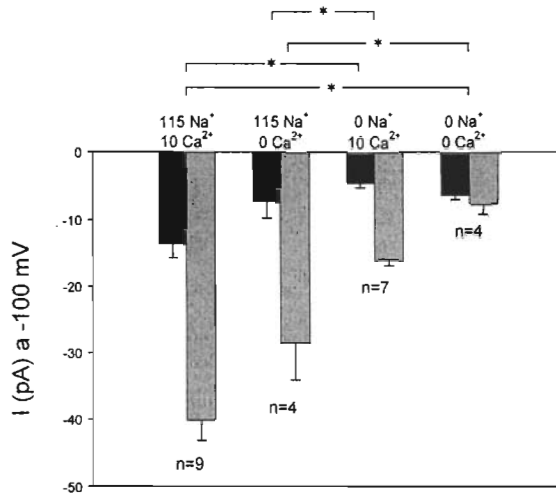
Por su parte, en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (SE4) la corriente disminuyó el 22 % con respecto a la activada en presencia de  $\text{Na}^+$  y alto  $\text{Ca}^{2+}$  (SE2), pero esta disminución, no fue estadísticamente significativa (Figura 10).

Cuando ambos cationes son sustituidos del medio extracelular la corriente disminuyó alrededor del 82 % en comparación a la activada en presencia de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  en la solución externa (Figura 10).

Estos resultados indican que la corriente es catiónica y que los principales acarreadores son los iones  $\text{Na}^+$ , con una baja contribución de iones  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### **8.4 SECRECIÓN DE INSULINA**

Resultados previos de nuestro laboratorio mostraron que la TG induce la secreción de insulina en ausencia de glucosa (Cruz-Cruz y col., 2005). Esto sugiere, que la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos intracelulares o bien la despolarización producida por TG, juegan un papel importante en la secreción de insulina de células  $\beta$  pancreáticas.



**Figura 10. La TG potencia una corriente catiónica portada principalmente por Na<sup>+</sup> en células β pancreáticas.** La gráfica muestra el promedio de la corriente al pico obtenida a -100 mV para cada una de las condiciones de registro. (\*) Denota la diferencia significativa entre los distintos grupos. Las barras negras representan el promedio de la corriente testigo a -100 mV y las barras grises el promedio de la corriente en respuesta a TG a -100mV.

Investigamos si el aumento en la secreción de insulina se debe a la entrada de Ca<sup>2+</sup> a través de canales de calcio tipo L o a otros mecanismos, tales como la liberación de Ca<sup>2+</sup> de depósitos intracelulares. Para ello medimos la secreción de insulina con el RHPA, en presencia de nifedipina 5 μM (un bloqueador de canales de Ca<sup>2+</sup> tipo L) y de TG 200 nM (Figura 11).

Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 11, en donde se puede apreciar, que en condiciones control (en ausencia de TG), las células β secretan 2.5 veces más insulina en 15.6 mM (concentración estimulante) que en 5.6 mM glucosa, considerada la concentración basal (Figura 11).

En presencia de TG se observó un incremento del 100 % en el área de inmunoplaaca en ambas concentraciones de glucosa y un incrementó en el

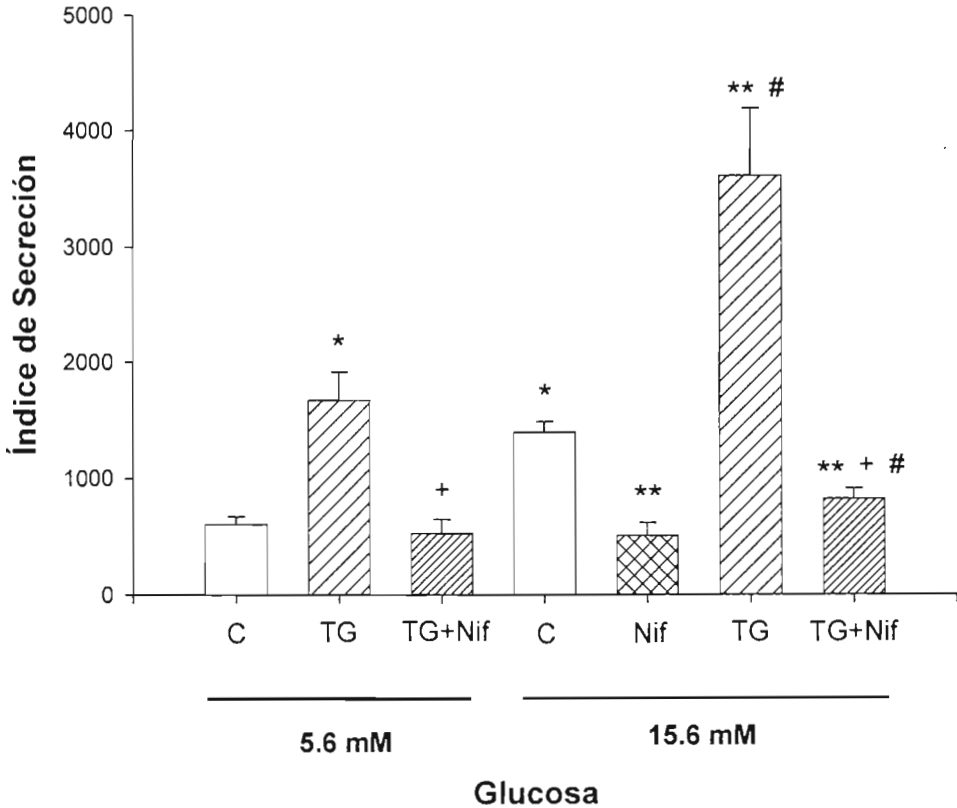
porcentaje de células secretoras de insulina del 18 % en 5.6 mM y del 34 % en 15.6 mM glucosa (Tabla III). En consecuencia, la TG aumentó 2.5 veces el índice de secreción en ambas concentraciones de glucosa, con respecto a sus controles (Figura 11).

Datos previos de nuestro laboratorio demostraron que la nifedipina no tiene efecto sobre la secreción de insulina en 5.6 mM glucosa (Rosenbaum y col., 2001). Por esta razón nuestros experimentos sólo muestran el efecto de nifedipina en 15.6 mM glucosa y como se puede apreciar en la figura 11, la nifedipina, en estas condiciones, bloqueó 60% el índice de secreción con respecto a las células control.

Cuando las células fueron incubadas simultáneamente con TG y nifedipina en 5.6 mM glucosa, no hubo cambios en el índice de secreción, con respecto a las células control (Figura 11). Sin embargo, el tratamiento con ambos en 15.6 mM glucosa, bloqueó sólo en un 34 % el índice de secreción comparado con su control. Este valor es 68 % más alto en comparación a las células tratadas solamente con nifedipina. Estos datos sugieren que cerca del 23 % de la secreción de insulina en presencia de TG, no depende de la activación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L.

La nifedipina bloqueó el 70 % de la secreción de insulina estimulada por TG en 5.6 mM de glucosa y el 78 % en 15.6 mM (Figura 11). Esta observación indica que la mayor parte del  $\text{Ca}^{2+}$  que estimula la secreción de insulina entra a la célula por medio de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L y que la secreción inducida por TG se debe, en parte al  $\text{Ca}^{2+}$  que es liberado de los depósitos intracelulares y a la activación de canales encargados de despolarizar la membrana hasta el voltaje al cual, aumenta la probabilidad de apertura de canales sensibles a voltaje ( $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ ).

Por otra parte, la TG aumentó el porcentaje de células secretoras de 44 % a 52 % en glucosa basal y de 50 % a 67 % en 15.6 mM glucosa. Este efecto fue revertido cuando se trataron a las células simultáneamente con TG y nifedipina.



**Figura 11. Efecto de la TG sobre la secreción de insulina en células  $\beta$  páncreáticas.** La secreción de insulina de células  $\beta$  aisladas se midió con la técnica de RHPA. C representa células control; TG, células expuestas a TG 200 nM; Nif, células expuestas a nifedipina 5  $\mu$ M; TG+Nif, células expuestas a TG 200 nM en presencia de nifedipina 5  $\mu$ M. Los datos se graficaron como el promedio ( $X$ )  $\pm$  ES del  $X$  de cuatro experimentos por duplicado. Los símbolos denotan la diferencia significativa (\*) con respecto al control en 5.6 mM glucosa, (+) con respecto a células tratadas con TG en ambas concentraciones de glucosa, (\*\*) con respecto a células control en 15.6 mM glucosa, (#) con respecto a células expuestas a nifedipina en 15.6 mM glucosa;  $p < 0.05$ .

Tratamiento	Glucosa (mM)	Células formadoras de placa (%)	Área de inmunoplaaca ( $\mu\text{m}^2$ )
Control	5.6	44 $\pm$ 2	1391 $\pm$ 124
	15.6	50 $\pm$ 1	2718 $\pm$ 439
Tg	5.6	52 $\pm$ 5*	2847 $\pm$ 331*
	15.6	67 $\pm$ 5*	5451 $\pm$ 776**
Nifedipina	15.6	34 $\pm$ 3**	1575 $\pm$ 510**
Tg + Nifedipina	5.6	40 $\pm$ 7	1292 $\pm$ 133
	15.6	50 $\pm$ 5	1799 $\pm$ 219**

**Tabla III. Secreción de insulina de células  $\beta$  aisladas en respuesta a TG en presencia de diferentes concentraciones de glucosa.** Los datos se muestran como el promedio  $\pm$  ES de cuatro experimentos por duplicado. (\*) Denota la diferencia significativa con respecto a 5.6 mM glucosa  $p < 0.01$ . (\*\*) Denota la diferencia significativa con respecto a 15.6 mM glucosa  $p < 0.01$ .

## IX DISCUSIÓN

Diversos trabajos han demostrado el papel de los canales KATP y de los canales dependientes de voltaje en la actividad eléctrica de las células  $\beta$ , sin embargo existen pocos estudios que consideren la importancia de los canales catiónicos no selectivos en este proceso. Como ya se menciono, estos canales participan en la fase de despolarización lenta que antecede a la fase de despolarización rápida y al potencial de meseta en el que se observa la descarga de potenciales de acción producida principalmente por la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L.

Algunos grupos sugieren que el vaciamiento de depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  producido por la TG podría generar una corriente de  $\text{Na}^+$  y/o de  $\text{Ca}^{2+}$  en células  $\beta$  implicada en la despolarización de la membrana plasmática, pero hasta el momento no existen reportes en los cuales se mida el efecto de la TG sobre la corriente macroscópica de estas células.

Por esa razón en este trabajo analizamos los efectos de la TG a corto plazo en células  $\beta$  pancreáticas, en las cuales, la corriente macroscópica se registró inmediatamente después de la aplicación de la TG.

Nuestros datos demuestran que la TG potencia una corriente catiónica permeable principalmente a  $\text{Na}^+$  ( $I_{\text{cat}}$ ) que en consecuencia ocasiona un incremento en la conductancia macroscópica de células  $\beta$  pancreáticas.

Otros estudios han descrito la presencia de una corriente catiónica permeable a  $\text{Na}^+$  en células  $\beta$  de ratón y en una línea celular de insulinoma (HIT-15). En estas células, la corriente catiónica es modulada por el carbacol, un análogo no hidrolizable de acetilcolina (Mears y Zimlik, 2004; Leech y Habener, 1998). Una corriente con características similares, pero activada por maitotoxina (MTX) fue descrita en células  $\beta$  pancreáticas de ratón (Worley III y col., 1994).

Se ha descrito en células  $\beta$ TC3 otra corriente catiónica activada por el vaciamiento de depósitos intracelulares, denominada  $I_{CRAN}$  (Roe y col., 1998). Esta corriente también es sensible a maitotoxina y es portada principalmente por  $Na^+$ .

Se ha observado en células  $\beta$  de humano una corriente catiónica no selectiva sensible a  $Ca^{2+}$ , activada por el péptido similar a glucagon 1 (GLP-1) se ha observado en células  $\beta$  de humano, de ratón e insulinoma humano (HIT-15) (Leech y Habener, 1997). Esta corriente se activa a concentraciones de glucosa bajas, lo que sugiere que puede jugar un papel importante en la despolarización de la membrana cuando el canal KATP está cerrado. Al igual que  $I_{CRAN}$ , esta corriente es activada por maitotoxina y bloqueada por SKF96365 (bloqueador específico de canales catiónicos no selectivos).

Existe otra corriente catiónica no selectiva en células  $\beta$  pancreáticas, la cual es activada por glucosa y es portada por  $Ca^{2+}$ , aunque su participación en la elevación de  $Ca^{2+}$  intracelular y en la secreción de insulina no ha sido estudiada (Rojas y col., 1990).

Se ha sugerido que los canales catiónicos no selectivos de células  $\beta$  son homólogos de la familia de canales TRP, los cuales fueron descritos inicialmente en células no excitables. Las células pancreáticas  $\beta$  de ratón expresan el gen que codifica para los canales TRPC1 y TRPC4 (Sakura y Ashcroft, 1997) los cuales, son canales catiónicos no selectivos operados por el vaciamiento de depósitos intracelulares, por lo que han sido clasificados dentro del grupo de canales SOC.

El papel de los canales TRPC1 y TRPC4 en las células  $\beta$  no es claro, ya que la sobreexpresión de estos canales en células de la línea tumoral  $\beta$  TC3 no producen corrientes en respuesta al vaciamiento de los depósitos intracelulares (Quian y col., 2002). Por esta razón es importante el estudio de células  $\beta$  pancreáticas en

ratones knockout para TRPC1 y TRPC4, con la finalidad de conocer la función de los canales TRP en estas células.

Por otra parte, se sabe que el vaciamiento de los depósitos intracelulares puede inducir una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , independiente de voltaje (Liu y Gylfe, 1997; Miura y col., 1997), la cual potencia la actividad eléctrica inducida por glucosa (Worley y col., 1994; Mears y col., 1997) en células  $\beta$  pancreáticas.

Estudios de nuestro grupo de trabajo, han demostrado que la TG, ante una concentración basal de glucosa, induce una despolarización lenta de las células  $\beta$  pancreática, la cual aumenta la actividad eléctrica y en consecuencia eleva la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Cruz-Cruz y col., 2005).

Aunque el estímulo con TG se mantenga, la presencia de nifedipina disminuye considerablemente la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que nos indica la importancia del influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales tipo L.

El incremento en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales tipo L, generado por la TG se produce de manera indirecta, ya que la TG no afecta el flujo de corriente a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L en las células  $\beta$  pancreáticas (Lemmens y col., 2001). En este sentido, sugerimos que la TG despolariza la membrana plasmática al activar  $I_{\text{cat}}$ , y esto incrementa la probabilidad de apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L.

En este trabajo observamos que la TG incrementa la secreción de insulina en ambas concentraciones de glucosa, lo cual, es el reflejo del incremento en la secreción de insulina de células aisladas y del incremento en el porcentaje de células secretoras, ya que la TG aumentó el área de inmunoplaaca y el número de células secretoras.



Datos previos de nuestro laboratorio han demostrado que la TG incrementa la secreción de insulina en ausencia de glucosa, y su efecto es similar al producido por carbacol en las mismas condiciones (Hiriart y Ramírez Medeles 1993).

La TG puede emplear diferentes mecanismos para incrementar la secreción de insulina en una concentración basal de glucosa, en primer lugar, puede elevar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular al bloquear su recaptura hacia los depósitos intracelulares, y en segundo, incrementa  $I_{\text{cat}}$ , la cual produce una despolarización que incrementa la actividad de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L.

Nuestros resultados sugieren que el principal mecanismo involucrado en el incremento de la secreción de insulina es la activación de  $I_{\text{cat}}$ , ya que la secreción producida por TG en 5.6 mM glucosa es completamente bloqueada en presencia de nifedipina, mientras que la inducida por este compuesto en 15.6 mM glucosa es bloqueada parcialmente.

Concluimos que el efecto de la TG potencia una  $I_{\text{cat}}$  que incrementa la despolarización de la membrana, lo cual inicia con la actividad eléctrica, la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y en consecuencia una elevación de la secreción de insulina. Estos efectos se atribuyen a la activación de canales catiónicos no selectivos, los cuales presentan una baja permeabilidad de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Sugerimos que a concentraciones basales de glucosa, cuando el canal KATP está abierto,  $I_{\text{cat}}$  se activa por el incremento en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  producido por el bloqueo de la SERCA por TG. La activación de  $I_{\text{cat}}$  produce una despolarización de la membrana plasmática que trae como resultado un incremento en la actividad de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L y en consecuencia un aumento de la secreción de insulina de células  $\beta$  pancreáticas (Figura 12).

En condiciones fisiológicas la  $I_{\text{cat}}$  podría ser activada por agonistas muscarínicos ya que los islotes pancreáticos son inervados por neuronas colinérgicas que

proviene del nervio vago (inervación parasimpática). La liberación de acetilcolina sobre las células  $\beta$ , induce la secreción de insulina al activar receptores muscarínicos presentes en la membrana plasmática de células  $\beta$  (Ahren y col., 1990; Stubbe y Steffens 1993). Este mecanismo eleva la insulina plasmática, antes de que se incremente la concentración de glucosa sanguínea (fase cefálica de la digestión).

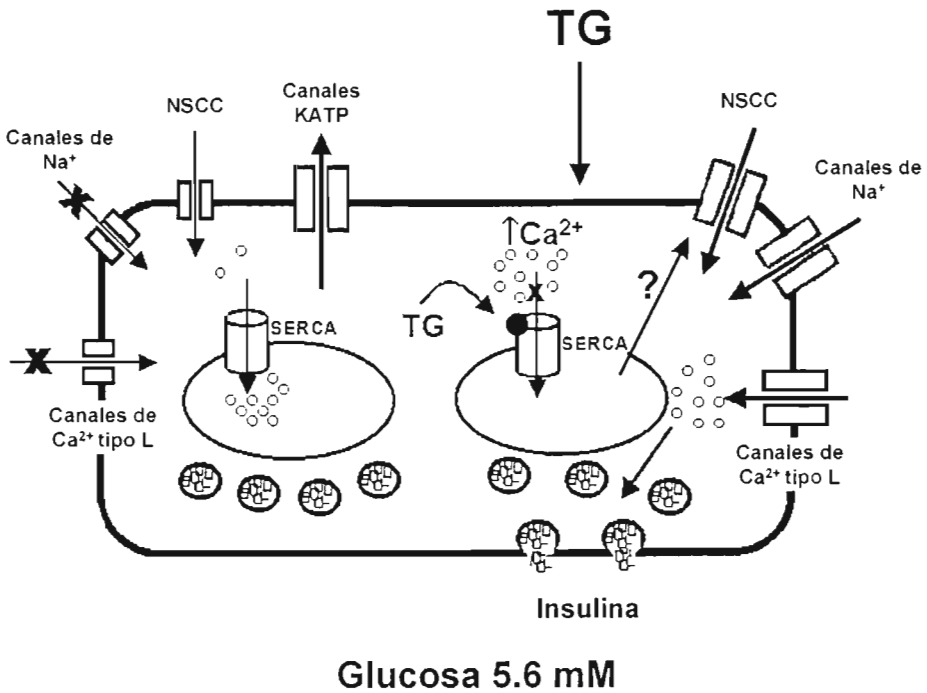


Figura 12. Modelo propuesto del efecto de la TG en las células  $\beta$  pancreáticas. A concentraciones basales de glucosa el vaciamiento de los depósitos intracelulares de  $Ca^{2+}$  producido por TG incrementa la actividad de  $I_{CaL}$ . Es probable que esta corriente despolarice la membrana plasmática y en consecuencia active canales de  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje, iniciando así, la actividad eléctrica y la secreción de insulina. Canales catiónicos no selectivos (NSCC).

La vía de señalización activada por acetilcolina y agonistas muscarínicos en las células  $\beta$  se lleva a cabo a través de receptores muscarínicos m1 y m3 (Iismaa y col., 2000). Estos receptores, participan en la activación de la fosfolipasa C (PLC), que hidroliza al fosfatidil inositol 4-5 bifosfato (PIP<sub>2</sub>) (Wollheim y Biden, 1986; Biden y col., 1993) IP<sub>3</sub> y diacilglicerol.

La activación de los receptores de IP<sub>3</sub> en la membrana del retículo endoplásmico, promueve la movilización de Ca<sup>2+</sup> hacia el citoplasma, lo que produce un incremento en la secreción de insulina (Wollheim y Biden, 1986).

Resulta necesario estudiar en detalle los mecanismos que producen la activación de estos canales. Sin embargo las propiedades de la corriente catiónica que describimos en este trabajo son similares a las descritas previamente en la literatura para canales catiónicos no selectivos en células  $\beta$  pancreáticas, las cuales son activadas por el vaciamiento de depósitos intracelulares de Ca<sup>2+</sup> (Roe y col., 1998; Liu y Gylfe, 1997; Miura y col., 1997).

Es probable que los canales catiónicos no selectivos de las células  $\beta$  pancreáticas sean canales TRP, ya que como se mencionó con anterioridad (Sakura y Ashcroft, 1997), subtipos como TRPC1 y TRPC4 se expresan en estas células. Los canales catiónicos de las células  $\beta$ , al igual que los canales TRP son canales catiónicos no selectivos, permeables preferentemente a Na<sup>+</sup> y a Ca<sup>2+</sup>. Un punto en común entre I<sub>cat</sub>, descrita en este trabajo, y la corriente generada a través de canales TRP es que no depende del voltaje y puede ser activada por el vaciamiento de depósitos intracelulares de Ca<sup>2+</sup>.

## X CONCLUSIONES

La TG potencia una corriente catiónica ( $I_{cat}$ ) en células  $\beta$  pancreáticas de rata

La TG incrementa la conductancia macroscópica de  $I_{cat}$ .

El canal catiónico sensible a TG es permeable principalmente a  $Na^+$ .

La TG aumenta la secreción de insulina de las células  $\beta$  pancreáticas aisladas tanto en 5.6 como en 15.6 mM glucosa.

La TG incrementa el porcentaje de células secretoras de insulina en ambas concentraciones de glucosa.

## XI PERSPECTIVAS

Con los datos obtenidos hasta el momento no podemos determinar con precisión el mecanismo mediante el cual la TG potencia  $I_{cat}$ , por esta razón es importante conocer la naturaleza del canal y saber si se trata de una especie desconocida o pertenece a alguna familia previamente descrita. El conocer su secuencia y estructura tridimensional permitirá dirigir fármacos específicos que intervengan directamente en su activación, inactivación y modulación. Estos fármacos podrán ser utilizados a la par con los ensayos de secreción.

Es importante unificar el concepto de canales catiónicos no selectivos en las células  $\beta$  pancreáticas, ya que hasta el momento no se sabe si todas las corrientes catiónicas descritas en la literatura fluyen a través de un mismo canal o bien participan diferentes isoformas y/o familias. Para ello es necesario hacer un estudio farmacológico y biofísico detallado en el que se analice el efecto de agonistas y antagonistas, la permeabilidad, las cinéticas de activación e inactivación y probablemente la dependencia de voltaje.

## XII REFERENCIAS

- Ahren, B., Karlsson, S., Lindskog, S. (1990) Cholinergic regulation of the endocrine pancreas. *Prog. Brain Res.* **84**:209-218
- Ashcroft, F. M. y Ashcroft, S. J. (1992) Mechanism of insulin secretion. En *Insulin, Molecular Biology to Pathology* (Ashcroft, F.M., y Ashcroft, S.J.H., eds) pp. 95-150, Oxford University Press.
- Baillyes, E. M., Guest, P. C., Hutton, J.C. (1992) Insulin synthesis. En *Insulin, Molecular Biology to Pathology* (Ashcroft, F.M., y Ashcroft, S.J.H., eds) pp. 64-92, Oxford University Press.
- Bakowski, D., Burgoyne, R. D., Parekh, A. B. (2003) Activation of the store-operated calcium current ICRAC can be dissociated from regulated exocytosis in rat basophilic leukaemia (RBL-1) cells. *J. Physiol.* **553**:387-393
- Benham, C. D., Davis, J. B., Randall, A. D. (2002) Vanilloid and TRP channels: a family of lipid-gated cation channels. *Neuropharmacology* **42**:873-888
- Benham, C. D., Gunthorpe, M. J., Davis, J. B. (2003) TRPV channels as temperature sensors. *Cell Calcium* **33**:479-487
- Biden, T. J., Davison, A. G., Prugue, M. L. (1993) Regulation by membrane potential of phosphatidylinositol hydrolysis in pancreatic islets. *J. Biol. Chem.* **268**:11065-11072
- Blondel, O., Takeda, J., Janssen, H., Seino, S., Bell, G. I. (1993) Sequence and functional characterization of a third inositol trisphosphate receptor subtype, IP3R-3, expressed in pancreatic islets, kidney, gastrointestinal tract, and other tissues. *J. Biol. Chem.* **268**:11356-11363
- Bodding, M., Wissenbach, U., Flockerzi, V. (2002) The recombinant human TRPV6 channel functions as Ca<sup>2+</sup> sensor in human embryonic kidney and rat basophilic leukemia cells. *J. Biol. Chem.* **277**:36656-36664
- Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D., Julius, D. (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**:816-824
- Caterina, M. J., Montell, C. (2005) Take a TRP to beat the heat. *Genes Dev.* **19**:415-418
- Chen, L., Koh, D. S. y Hille, B. (2003) Dynamics of calcium clearance in mouse pancreatic beta-cells. *Diabetes* **52**:1723-1731

- Chyb, S., Raghu, P., Hardie, R. C. (1999) Polyunsaturated fatty acids activate the *Drosophila* light-sensitive channels TRP and TRPL. *Nature* **397**:255-259
- Cook, D. L., Satin, L. S., Ashford, M. L. y Hales, C. N. (1988) ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in pancreatic  $\beta$  cells. Spare-channel hypothesis. *Diabetes* **37**:495-498
- Cruz-Cruz, R., Salgado, A., Sanchez-Soto, C., Vaca, L., Hiriart, M. (2005) A thapsigargin-sensitive cationic current leads to membrane depolarization, calcium entry and insulin secretion in rat pancreatic beta-cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* En prensa
- de Miguel, R., Tamagawa, T., Schmeer, W., Nenquin, M. y Henquin, J. C. (1988) Effects of acute sodium omission on insulin release, ionic flux and membrane potential in mouse pancreatic  $\beta$  cells. *Biochim. Biophys. Acta* **969**:198-207
- Ding, W. G., He, L.P., Omatsu-Kanbe, M. y Kitasato, H. (1996) A possible role of the ATP-sensitive potassium ion channel in determining the duration of spikebursts in mouse pancreatic  $\beta$  cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1279**:219-226
- Dunne, M. J., Yule, D. I., Gallacher, D. V., Petersen, O. H. (1990) Stimulant-evoked depolarization and increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in insulin-secreting cells is dependent on external Na<sup>+</sup>. *J. Membr. Biol.* **113**:131-138
- Dyachok, O., Tufveson, G. y Gylfe, E. (2004) Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release by activation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in primary pancreatic  $\beta$  cells. *Cell Calcium* **36**:1-9
- Fleig, A., Penner, R. (2004) The TRPM ion channel subfamily: molecular, biophysical and functional features. *Trends Pharmacol. Sci.* **25**:633-639
- Gopel, S. O., Kanno, T., Barg, S., Eliasson, L., Galvanovskis, J., Renstrom, E. y Rorsman, P. (1999) Activation of Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels contributes to rhythmic firing of action potentials in mouse pancreatic  $\beta$  cells. *J. Gen. Physiol.* **114**:759-770
- Grimm, C., Kraft, R., Schultz, G., Harteneck, C. (2005) Activation of the melastatin-related cation channel TRPM3 [corrected] by D-erythro-sphingosine. *Mol. Pharmacol.* **67**:798-805
- Gromada, J., Frokjaer-Jensen, J. y Dissing, S. (1996) Glucose stimulates voltage- and calcium-dependent inositol trisphosphate production and intracellular calcium mobilization in insulin-secreting  $\beta$ -TC3 cells. *Biochem. J.* **314**:339-345

- Gunthorpe, M. J., Benham, C. D., Randall, A., Davis, J. B. (2002) The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels. *Trends Pharmacol. Sci.* **23**:183-191
- Henquin, J. C., Garcia, M. C., Bozem, M., Hermans, M. P. y Nenquin M. (1988) Muscarinic control of pancreatic  $\beta$  cell function involves sodium-dependent depolarization and calcium influx. *Endocrinology* **122**:2134-2142
- Hiriart, M. y Matteson, D. R. (1988)  $\text{Na}^+$  channels and two types of  $\text{Ca}^{2+}$  channels in rat pancreatic  $\beta$  cells identified with the reverse hemolytic plaque assay. *J. Gen. Physiol.* **91**(5):617-639
- Hiriart, M. y Ramirez-Medeles, M. C. (1991) Functional subpopulations of individual pancreatic  $\beta$  cells in culture. *Endocrinology* **128**:3193-3198
- Hiriart, M. y Ramírez-Medeles, M. C. (1993) Muscarinic modulation of insulin secretion by single pancreatic  $\beta$  cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **93**:63-69
- Hofmann, T., Obukhov, A. G., Schaefer, M., Harteneck, C., Gudermann, T., Schultz, G. (1999) Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* **397**:259-263
- Hofmann, T., Chubakov, V., Gudermann, T., Montell, C. (2003) TRPM5 is a voltage-modulated and  $\text{Ca}^{2+}$ -activated monovalent selective cation channel. *Curr. Biol.* **13**:1153-1158
- Iismaa, T. P., Kerr, E. A., Wilson, J. R., Carpenter, L., Sims, N., Biden, T. J. (2000) Quantitative and functional characterization of muscarinic receptor subtypes in insulin-secreting cell lines and rat pancreatic islets. *Diabetes* **49**:392-8
- Irvine, R. F. (1990) 'Quantal'  $\text{Ca}^{2+}$  release and the control of  $\text{Ca}^{2+}$  entry by inositol phosphates - a possible mechanism. *FEBS Lett.* **263**:5-9
- Johnson, J. D., Kuang, S., Mislter, S. y Polonsky, K. S. (2004) Ryanodine receptors in human pancreatic  $\beta$  cells: localization and effects on insulin secretion. *FASEB J.* **18**:878-880
- Kim, S. K. y Hebrok, M. (2001) Intercellular signals regulating pancreas development and function. *Genes Dev.* **15**:111-127
- Kulkarni, R. N., Roper, M. G., Dahlgren, G., Shih, D. Q., Kauri, L. M., Peters, J. L., Stoffel, M. y Kennedy, R. T. (2004) Islet secretory defect in insulin receptor substrate 1 null mice is linked with reduced calcium signaling and expression of sarco(endo)plasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA)-2b and -3. *Diabetes* **53**:1517-1525



Lee, B. y Laychock, S. G. (2001) Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoform expression in mouse pancreatic islets: effects of carbachol. *Biochem. Pharmacol.* **61**:327-336

Leech, C.A., Holz, G. G., Habener, J. F. (1995) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induces the voltage-independent activation of inward membrane currents and elevation of intracellular calcium in HIT-T15 insulinoma cells. *Endocrinology* **136**:1530-1536

Leech, C. A. y Habener, J. F. (1997) Insulinotropic glucagon-like peptide-1-mediated activation of non-selective cation currents in insulinoma cells is mimicked by maitotoxin. *J. Biol. Chem.* **272**:17987-17993

Leech, C. A. y Habener, J. F. (1998) A role for Ca<sup>2+</sup>-sensitive nonselective cation channels in regulating the membrane potential of pancreatic beta-cells. *Diabetes* **47**:1066-1073

Lemmens, R., Larsson, O., Berggren, P. O. e Islam, M. S. (2001) Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release from the endoplasmic reticulum amplifies the Ca<sup>2+</sup> signal mediated by activation of voltage-gated L-type Ca<sup>2+</sup> channels in pancreatic beta-cells. *J. Biol. Chem.* **276**:9971-9977

Liu, Y. J., y Gylfe, E. (1997) Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in insulin-releasing pancreatic  $\beta$  cells. *Cell Calcium* **22**:277-286

Lomedico, P., Rosenthal, N., Efstratidis, A., Gilbert, W., Kolodner, R. y Tizard, R. (1979) The structure and evolution of the two nonallelic rat preproinsulin genes. *Cell* **18**:545-558

Ma, H. T., Patterson, R. L., van Rossum, D. B., Birnbaumer, L., Mikoshiba, K., Gill, D. L. (2000) Requirement of the inositol trisphosphate receptor for activation of store-operated Ca<sup>2+</sup> channels. *Science* **287**:1647-1651

MacDonald, P. E., Ha, X. F., Wang, J., Smukler, S. R., Sun, A. M., Gaisano, H. Y., Salapatek, A. M., Backx, P. H. y Wheeler, M. B. (2001) Members of the Kv1 and Kv2 voltage-dependent K<sup>+</sup> channel families regulate insulin secretion. *Mol. Endocrinol.* **15**:1423-1435

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. y Wheeler M. B. (2002) Inhibition of Kv2.1 voltage-dependent K<sup>+</sup> channels in pancreatic  $\beta$  cells enhances glucose-dependent insulin secretion. *J Biol. Chem.* **277**:44938-44945

Mears, D., Sheppard, N. F. Jr., Atwater, I., Rojas, E., Bertram, R. y Sherman, A. (1997) Evidence that calcium release-activated current mediates the biphasic electrical activity of mouse pancreatic  $\beta$  cells. *J. Membr. Biol.* **155**:47-59

- Mears, D., y Zimlik, C.L. (2004) Muscarinic agonists activate  $Ca^{2+}$  store-operated and  $\beta$ -independent ionic currents in insulin-secreting HIT-T15 cells and mouse pancreatic  $\beta$  cells. *J. Membr. Biol.* **197**:59-70
- Mears, D. (2004) Regulation of insulin secretion in islets of Langerhans by  $Ca^{2+}$  channels. *J. Membr. Biol.* **200**:57-66
- Misler, S., Barnett, D. W., Gillis, K. D. y Pressel, D. M. (1992a) Electrophysiology of stimulus-secretion coupling in human  $\beta$  cells. *Diabetes* **41**:1221-1228
- Misler, S., Barnett, D. W., Pressel, D. M., Gillis, K. D., Scharp, D. W., Falke, L. C. (1992b) Stimulus-secretion coupling in  $\beta$  cells of transplantable human islets of Langerhans. Evidence for a critical role for  $Ca^{2+}$  entry. *Diabetes* **41**:662-670
- Miura, Y., Henquin, J. C. y Gilon, P. (1997). Emptying of intracellular  $Ca^{2+}$  stores stimulates  $Ca^{2+}$  entry in mouse pancreatic  $\beta$  cells by both direct and indirect mechanisms. *J. Physiol.* **503**:387-398
- Montell, C. (2001) Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels. *Sci. STKE.* **90**:RE1
- Murata, M., Gusovsky, F., Yasumoto, T., Daly, J. W. (1992) Selective stimulation of  $Ca^{2+}$  flux in cells by maitotoxin. *Eur. J. Pharmacol.* **227**:43-49
- Mutai, H., Heller, S. (2003) Vertebrate and invertebrate TRPV-like mechanoreceptors. *Cell Calcium* **33**:471-478
- Neher, E. y Sakmann, B. (1992) The patch clamp technique. *Sci. Am.* **266**:28-35
- Neill, J. D., y Frawley, L. S. (1983) Detection of hormone release from individual cells in mixed populations using a reverse haemolytic plaque assay. *Endocrinology* **112**:1135-1137
- Nelson, D. L. y Cox, M. M. (2000) Glycolysis and the catabolism of hexoses. En Lehninger Principles of Biochemistry (Nelson, D. L. y Cox, M. M. eds) pp 527-566, Worth Publishers, 3a. Ed.
- Ozawa, S. y Sand, O. (1986) Electrophysiology of excitable endocrine cells. *Physiol. Rev.* **66**:887-952
- Patterson, R. L., van Rossum, D. B., Gill, D. L. (1999) Store-operated  $Ca^{2+}$  entry: evidence for a secretion-like coupling model. *Cell* **98**:487-499
- Perraud, A. L., Takanishi, C. L., Shen, B., Kang, S., Smith, M. K., Schmitz, C., Knowles, H. M., Ferraris, D., Li, W., Zhang, J., Stoddard, B. L., Scharenberg, A. M.

(2005) Accumulation of free ADP-ribose from mitochondria mediates oxidative stress-induced gating of TRPM2 cation channels. *J. Biol. Chem.* **280**:6138-6148

Prawitt, D., Montellh-Zoller, M. K., Brixel, L., Spangenberg, C., Zabel, B., Fleig, A., Penner, R. (2003) TRPM5 is a transient  $Ca^{2+}$ -activated cation channel responding to rapid changes in  $[Ca^{2+}]_i$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:15166-15171

Pressel, D. M. y Mislser, S. (1991) Role of voltage-dependent ionic currents in coupling glucose stimulation to insulin secretion in canine pancreatic islet  $\beta$ -cells. *J. Membr. Biol.* **124**:239-253

Putney, J. W. Jr., McKay, R. R. (1999) Capacitative calcium entry channels. *Bioessays* **21**:38-46

Qian, F., Huang, P., Ma, L., Kuznetsov, A., Tamarina, N., Philipson, L. H. (2002) TRP genes: candidates for nonselective cation channels and store-operated channels in insulin-secreting cells. *Diabetes* **51**:S183-189

Randriamampita, C. y Tsien, R. Y. (1993) Emptying of intracellular  $Ca^{2+}$  stores releases a novel small messenger that stimulates  $Ca^{2+}$  influx. *Nature* **364**:809-814

Roe, M. W., Lancaster, M. E., Mertz, R. J., Worley, J. F. III y Dukes, I. D. (1993) Voltage-dependent intracellular calcium release from mouse islets stimulated by glucose. *J. Biol Chem.* **268**:9953-9956

Roe, M. W., Worley, J. F. III, Mittal, A. A., Kuznetsov, A., DasGupta, S., Mertz, R. J., Witherspoon, S. M. III, Blair, N., Lancaster, M. E., McIntyre, M. S., Shehee, W. R., Dukes, I. D. y Philipson, L. H. (1996) Expression and function of pancreatic  $\beta$  cell delayed rectifier  $K^+$  channels. *J. Biol. Chem.* **271**:32241-32246

Roe, M. W., Worley, J. F. III, Qian, F., Tamarina, N., Mittal, A. A., Dralyuk, F., Blair, N. T., Mertz, R. J., Philipson, L.H. y Dukes, I. D. (1998) Characterization of a  $Ca^{2+}$  release-activated nonselective cation current regulating membrane potential and  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations in transgenically derived  $\beta$  cells. *J. Biol. Chem.* **273**:10402-10410

Rojas, E., Hidalgo, J., Carroll, P. B., Li, M. X. y Atwater, I. (1990) A new class of calcium channels activated by glucose in human pancreatic  $\beta$  cells. *FEBS Lett.* **261**:265-270

Rojas, E., Carroll, P. B., Ricordi, C., Boschero, A. C., Stojilkovic, S. S. y Atwater, I. (1994) Control of cytosolic free calcium in cultured human pancreatic  $\beta$  cells occurs by external calcium-dependent and independent mechanisms. *Endocrinology* **134**:1771-1781.

Rosario, L. M., Barbosa, R. M., Antunes, C. M., Silva, A. M., Abrunhosa, A. J. y Santos R. M. (1993) Bursting electrical activity in pancreatic beta-cells: evidence

that the channel underlying the burst is sensitive to  $Ca^{2+}$  influx through L-type  $Ca^{2+}$  channels. *Pflugers. Arch.* **424**:439-447

Rosenbaum, T., Sanchez-Soto, M. C. y Hirriart, M. (2001) Nerve growth factor increases insulin secretion and barium current in pancreatic  $\beta$  cells. *Diabetes* **50**:1755-1762

Sakura, H., Ashcroft, F. M. (1997) Identification of four TRP1 gene variants murine pancreatic  $\beta$  cells. *Diabetologia* **40**:528-532

Saltiel, A. R. (1996) Diverse signaling pathways in the cellular actions of insulin. *Am. J. Physiol.* **270**:E375-385

Scott, C. C., Furuya, W., Trimble, W. S., Grinstein, S. (2003) Activation of store-operated calcium channels: assessment of the role of snare-mediated vesicular transport. *J. Biol Chem.* **278**:30534-30539

Shepherd, P. R. y Kahn, B. B. (1999) Glucose transporters and insulin action. *N. Engl. J. Med.* **341**:248-257

Smith, P. A., Ashcroft, F. M. y Fewtrell CM. (1993) Permeation and gating properties of the L-type calcium channel in mouse pancreatic  $\beta$  cells. *J. Gen. Physiol.* **101**:767-797

Soergel, D. G., Gusovsky, F., Yasumoto, T., Daly, W. J. (1990) Stimulatory effects of maitotoxin on insulin release in insulinoma HIT cells: role of calcium uptake and phosphoinositide breakdown. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **255**:1360-1365

Stagner, J. I. y Samols, E. (1990) Islet somatostatin -microvascular, paracrine, and pulsatile regulation. *Metabolism* **39**:55-60

Story, G. M., Peier, A. M., Reeve, A. J., Eid, S. R., Mosbacher, J., Hricik, T. R., Earley, T. J., Hergarden, A. C., Andersson, D. A., Hwang, S. W., McIntyre, P., Jegla, T., Bevan, S., Patapoutian, A. (2003) ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* **112**:819-829

Strubbe, J. H., and Steffens, A. B. (1993) Neural control of insulin secretion. *Horm Metab Res.* **10**:507-512

Sturgess, N. C., Hales, C. N., Ashford, M. L. J., (1986) Inhibition of a calcium-activated, non-selective cation channel, in a rat insulinoma cell line, by adenine derivatives. *FEBS Lett.* **208**:397-400

Thastrup, O., Cullen, P. J., Drobak, B. K., Hanley, M. R. y Dawson, A. P. (1990) Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular  $Ca^{2+}$  stores by specific

inhibition of the endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:2466-2470

Varadi, A., Molnar, E. y Ashcroft, S. J. (1995) Characterisation of endoplasmic reticulum and plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases in pancreatic  $\beta$  cells and in islets of Langerhans. *Biochim. Biophys. Acta* **1236**:119-127

Vazquez, G., Wedel, B. J., Aziz, O., Trebak, M., Putney, J. W. Jr. (2004) The mammalian TRPC cation channels. *Biochim. Biophys. Acta* **1742**:21-36

Vidaltamayo, R., Sanchez-Soto, M. C. e Hiriart, M. (2002) Nerve growth factor increases sodium channel expression in pancreatic  $\beta$  cells: implications for insulin secretion. *FASEB J.* **16**:891-892

Wentworth, B. M., Schaefer, I. M, Villa-Komaroff, L. y Chirgwin, J. M. (1986) Characterization of the two nonallelic genes encoding mouse preproinsulin. *J. Mol. Evol.* **23**:305-312

Wollheim, C. B., Biden, T. J. (1986) Signal transduction in insulin secretion: comparison between fuel stimuli and receptor agonists. *Ann N Y Acad Sci.* **488**:317-33

Worley, J. F. III, McIntyre, M. S., Spencer, B., y Dukes, I. D. (1994) Depletion of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores activates a maitotoxin-sensitive nonselective cationic current in  $\beta$  cells. *J. Biol. Chem.* **269**:32055-32058

Xu, G. G., Gao, Z. Y., Borge, P. D. Jr., Jegier, P. A., Young, R. A., y Wolf, B. A. (2000) Insulin regulation of  $\beta$  cell function involves a feedback loop on SERCA gene expression,  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis, and insulin expression and secretion. *Biochemistry* **39**:14912-14919

**A THAPSIGARGIN-SENSITIVE CATIONIC CURRENT LEADS TO  
MEMBRANE DEPOLARIZATION, CALCIUM ENTRY AND INSULIN  
SECRETION IN RAT PANCREATIC BETA-CELLS**

**R. Cruz-Cruz, A. Salgado\*, C. Sánchez-Soto, L. Vaca\*, M. Hiriart**

**From the Department of Biophysics, and \*Dept of Cell Biology, Instituto de Fisiología  
Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, Circuito Exterior,  
Ciudad Universitaria, Mexico City, D.F. 04510, MEXICO**

Running head: Thapsigargin-sensitive cationic current in  $\beta$ -cells

Address correspondence to: Dr. Marcia Hiriart, Department of Biophysics, Instituto de Fisiología  
Celular, UNAM; Ciudad Universitaria, AP 70-253 Coyoacán, México D.F. 04510, MÉXICO; FAX:  
(525) 622 5607; E-mail: mhiriart@ifc.unam.mx

**ABSTRACT**

Glucose-induced insulin secretion by pancreatic  $\beta$ -cells depends on membrane depolarization and  $[Ca^{2+}]_i$  increase. We correlated voltage- and current-clamp recordings,  $[Ca^{2+}]_i$  measurements and insulin reverse hemolytic plaque assay to analyze the activity of a thapsigargin-sensitive cationic channel that can be important for membrane depolarization in single rat pancreatic  $\beta$ -cells.

We demonstrate the presence of a thapsigargin-sensitive cationic current which is mainly carried by  $Na^+$ . Moreover, in basal glucose concentration (5.6 mM), thapsigargin depolarizes the plasmatic membrane producing electrical activity and increases  $[Ca^{2+}]_i$ . The later is prevented by nifedipine, indicating that  $Ca^{2+}$  enters the cell through L-type  $Ca^{2+}$  channels, which are activated by membrane depolarization.

Thapsigargin also increased insulin secretion by increasing the percentage of cells secreting insulin and amplifying hormone secretion by individual  $\beta$ -cells. Nifedipine blocked the increase completely in 5.6 mM glucose and partially in 15.6 mM glucose. We conclude that thapsigargin potentiates a cationic current that depolarizes the cell membrane. This in turn, increases  $Ca^{2+}$  entry through L-type  $Ca^{2+}$ -channels promoting insulin secretion.

**KEYWORDS**

Non-selective cationic channels, calcium channels, stimulus-secretion coupling

## INTRODUCTION

GLUCOSE-INDUCED INSULIN SECRETION by pancreatic  $\beta$  cells depends on the rise of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$   $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . In non-stimulating glucose concentrations (below 6.0 mM), the membrane potential is at resting level. When glucose concentration increases,  $\beta$ -cell membrane exhibits an oscillating electrical activity. First, a slow membrane depolarization is observed, this is followed by a fast depolarization phase to a plateau level, on which bursts of action potentials are superimposed and finally the membrane repolarizes. The time that the membrane spends firing in the depolarized plateau state is determined by extracellular glucose concentration (17).

It is well accepted that when the glucose concentration raises, the ATP/ADP ratio increases as a result of glucose metabolism, leading to the closure of  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channels (1). This leads to a slow membrane depolarization via non-selective cationic channels, resulting in the subsequent activation of voltage-sensitive  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  channels (22).  $\text{Ca}^{2+}$  entry through L-type channels is a determining factor for insulin secretion (11).

The slow depolarization that follows  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channel closure is an important event that is not fully understood. It has been suggested that it is due to sodium entrance through a yet unidentified voltage-independent cationic channel, since a study shows that this depolarization is eliminated by the removal of extracellular  $\text{Na}^+$  (3). Alternatively, it has been shown that maneuvers that deplete intracellular calcium stores, such as the application of the microsomal  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase inhibitor thapsigargin (TG), or activation of G-protein-coupled receptors associated to the inositol triphosphate ( $\text{IP}_3$ ) cascade also result in the activation of non-selective cationic currents in a wide variety of cells, including the murine insulinoma BTC3-neo cells (18). This current referred to as  $\text{Ca}^{2+}$ -release-activated non-selective current ( $I_{\text{CRAN}}$ ) is activated also by the non-selective cationic current activator, maitotoxin.



It has been shown that maitotoxin induces cell membrane depolarization, as a result of increased  $\text{Na}^+$  permeability in mouse  $\beta$ -cells, resembling the effects of high glucose concentrations on cell membrane potential (23).

In order to explore cationic channels that could be important for membrane depolarization in rat pancreatic  $\beta$ -cells, we analyzed the early effects of TG on: 1) cationic currents, 2) electrical activity, 3) intracellular calcium concentration and 4) insulin secretion.

We demonstrate a direct correlation between the activation of a TG-sensitive cationic channel, cell depolarization, changes in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  and insulin secretion in pancreatic  $\beta$ - cells.

## MATERIAL AND METHODS

*Materials.* Reagents were obtained from the following sources: collagenase type IV from Worthington (Freehold, NJ); guinea-pig insulin antiserum from Biogenesis (Sandown, NH); bovine serum albumin, Hanks' balanced salt solution (HBSS), chromium chloride, staphylococcal protein A, HEPES, trypsin, trypan blue, nystatin and poly-L-lysine from Sigma (St. Louis, MO); tissue culture dishes (Corning); Spinner-Eagles' salt solution from Microlab (Mexico D.F., Mexico); fetal bovine serum from Equitech-Bio (Ingram, Tx); guinea-pig complement, RPMI-1640 salts, and penicillin-streptomycin-amphotericin B solution from Life Technologies (Grand Island, NY); thapsigargin from Alomone Labs (Jerusalem, Israel); fluo-4-AM from Molecular Probes (Eugene, OR).

*Pancreatic  $\beta$ -cell culture.* Animal care was performed according to the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH No. 85-23, reviewed 1985). Young adult male Wistar rats (250-280 g) were obtained from the local animal facility, maintained in a 14 h light (0600-2000)/10 h dark cycle, and allowed free access to standard laboratory rat diet

and tap water. Animals were anesthetized with sodium pentobarbital (40 mg/kg), and after pancreas dissection were killed by cervical dislocation.

Single pancreatic  $\beta$ -cells were obtained by collagenase digestion and islet dissociation by mechanical disruption in calcium-free medium, as described previously (15). Single  $\beta$ -cells were plated at low density (10000 cells/cm<sup>2</sup>) on glass coverslips previously coated with poli-L-lysine and cultured for 24 to 72 h, in RPMI-1640 supplemented with 200 U/ml penicillin G, 200 mg/ml streptomycin, 0.5 mg/ml amphotericin B, and 10 % of fetal bovine serum (FBS).

*Electrophysiological Recordings and Analysis.* Whole-cell voltage-clamp recordings (2) were performed at 20-22° C using an Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA). Patch electrodes were pulled from Kimax-51 capillary tubes (Kimble Glass Inc., Vineland, NJ) and had a tip resistance of 1.5 to 3 M $\Omega$ . Electrode tips were coated with Sylgard (Dow Corning, Midland, MI).

The pulse protocol used for the analysis of the currents consisted of applying depolarizing test pulses from -120 to +60 mV in 20 mV steps for 250 ms, from a holding potential of -80 mV. After recording control currents, thapsigargin (200 nM) was added with the aid of a Picospritzer (General Valve, NY).

The whole-cell conductance of the TG-activated current was calculated using equation 1:

$$g = (I_2 - I_1) / (V_2 - V_1)$$

where  $I_2$  is the current measured at -100 mV ( $V_2$ ) and  $I_1$  is the current measured at the holding potential at -80 mV ( $V_1$ ).

*Current clamp experiments.* The perforated mode of the patch clamp technique was utilized in all measurements. An EPC9 amplifier was used. Data acquisition was controlled by the Pulse connected to the bath solution via a 100 mM KCl agar bridge. Nystatin was dissolved in methanol and added to the pipette solution at a final concentration of 100  $\mu$ g/ml.

Current clamp experiments were performed as previously described (20). Briefly, the patch pipette was filled with nystatin solution and once a  $G\Omega$  seal was formed, cell capacitative artifacts were monitored in response to a 1 mV voltage step until electrical access was gained. After this, the amplifier mode was switched from voltage-clamp to current-clamp and the experiments were conducted as described in the legend of figure 3.

*Recording solutions.* The ionic composition of the external solutions is summarized in Table 1.

*Internal Solution (mM)*

115 CsAsp, 10 CsCl, 5 CsF, 2.5 EGTA, mM HEPES, 10, pH 7.2, 290-295 mOsm. For perforated patch experiments the CsAsp was replaced by 115 KAsp.

*Confocal Calcium Measurements.* Changes in cytosolic calcium in pancreatic  $\beta$ -cells were monitored using the fluorescent calcium indicator fluo-4-AM as previously described (21). Briefly, cells were placed on glass coverslips and allowed to attach to the glass surface for 24 h in RPMI with 10% BFS. The cells were then loaded with 5  $\mu$ M fluo-4-AM diluted in RPMI media and incubated for 30 min at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. Following incubation, cells were washed once with low-glucose physiological solution (containing in mM: 120 NaCl, 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 4.75 KCl, 5.6 glucose, 20 HEPES and 0.05% BSA). Calcium measurements were carried out using a BioRad MRC 1024 confocal microscope. The excitation wavelength was 488 nm and emission was collected at 535 nm. An increment in the intensity of fluorescence indicated an increase in cytosolic calcium. The average of 3 images was recorded every 3 s. All drugs were applied to the dish with a micropipette. In some experiments, cells were incubated for 5 min at room temperature with nifedipine (5  $\mu$ M) prior to the addition of TG. Cell fluorescence was subtracted from background and autofluorescence.

*Reverse hemolytic plaque assay (RHPA).* To identify insulin-secreting cells and measure insulin secretion by single cells we used a RHPA (16) as described previously (15). Briefly, after 48 h in culture, cells were challenged for 1 h in HBSS containing 5.6 or 15.6 mM glucose, in control conditions or with TG (200 nM), in the presence of an insulin antiserum (1:20 in HBSS), and further incubated for 30 min with guinea pig complement. Insulin released during the incubation time was revealed by the presence of hemolytic plaques surrounding insulin-secreting cells. The size of the plaques was measured by projecting the image on a monitor attached to a video camera and Nikon Axiophot inverted microscope, with the aid of the JAVA video analysis software (Version 1.40; Jandel Scientific, Corte Madera, CA).

Plaque size was expressed as area; cells that formed plaques were counted, and the results were expressed as the percentage of insulin secreting cells. All experiments were performed by duplicate, and at least 100 cells were counted per experimental condition. The overall secretory activity of  $\beta$ -cells under a given experimental condition was expressed as a secretion index, calculated by multiplying the average plaque area by the percentage of plaque-forming cells.

*Statistical Analysis.* Significant differences between data were evaluated by analysis of variance (ANOVA), followed by Fisher's multiple range test, using the Number Cruncher statistical system (NCSS 4.2, Dr. Jerry L. Hintze, Kaysville, UT). All results are expressed as mean  $\pm$  SEM.

## RESULTS

*TG increases a cationic current in  $\beta$ -cells.* We used whole-cell configuration of the patch-clamp technique to measure the effects of TG on membrane currents in single rat  $\beta$ -cells. Figure 1A illustrates representative families of current traces recorded in response to different voltage pulses from a holding potential of -80 mV, before (1) and after exposure to 200 nM TG (2). The effects of

TG developed immediately after application of the reagent and were not reversible following its withdrawal (data not shown). Figure 1B shows the mean  $\pm$  SEM current to voltage (I-V) relationships obtained in 4 different experiments. The reversal potential of the current in control conditions is around 0 mV and does not significantly changes with TG application.

The slope conductances were calculated according to equation 1 (see Material and methods section). Assuming a capacitance of 8.4 pF, slope conductance was 20 pS/pF for control cells and 33 pS/pF for TG-treated  $\beta$ -cells. These results demonstrate that TG increases a small cationic current ( $I_{cat}$ ).

We then studied the ionic selectivity of  $I_{cat}$  by replacing  $Na^+$  with NMDG or removing  $Ca^{2+}$  from the external solution. I-V curves obtained in each condition are illustrated in figure 2. As shown in Figure 2 A,  $I_{cat}$  decreased when  $Na^+$  was replaced with NMDG in the external solution (Table 1, 2), compared to control conditions (figure 1B). The current measured at -100 mV (figure 2D) decreased nearly by 65 % compared to control conditions (Table 1, 1).

In contrast, in  $Ca^{2+}$  free solution (Table 1, 3) the current magnitude decreased, but changes are not statistically significant (Figure 2B and D) compared to control conditions (Fig 1B; Table 1, 1).

When both cations were omitted from the external media (Table 1, 4), the currents were minimized (figure 2C and D). Under these conditions, TG-sensitive  $I_{cat}$  was reduced by 82 % compared to the current recorded in the external solution with  $Na^+$  and  $Ca^{2+}$  (Fig 1B; Table 1,1). These results indicate that the principal charge carrier of  $I_{cat}$  is  $Na^+$ , with a minimal contribution of  $Ca^{2+}$  ions.

*TG increases electrical activity in  $\beta$ - cells.* We studied the effects of TG on single  $\beta$ -cell electrical activity in 5.6 mM glucose with the current-clamp perforated patch-clamp technique. Figure 3A shows that in control conditions cells were polarized, around -70 mV and electrically silent. Few seconds after TG application the membrane slowly depolarized to a plateau level where action

potentials were superimposed. Figure 3B shows the mean firing frequency of 14 different cells in the presence of 5.6 mM glucose indicating that TG induced depolarization and electrical activity even at this low glucose concentration; when the  $K_{ATP}$  is presumably active.

*TG increases intracellular calcium in  $\beta$ - cells.* In order to evaluate the effect of TG on  $[Ca^{2+}]_i$  in 5.6 mM glucose we measured single  $\beta$ -cells fluorescence with confocal microscopy. Figure 4A shows that TG increased  $[Ca^{2+}]_i$  in the cells, which remained elevated throughout the recording period. In contrast, in the presence of nifedipine, calcium signals were transient (figure 4B). This result indicates that the sustained phase of the  $[Ca^{2+}]_i$  increment is the result of calcium influx through L-type  $Ca^{2+}$  channels. Moreover, when  $[Ca^{2+}]_i$  was measured in a  $Ca^{2+}$  free-solution, the sustained phase of the calcium signal induced by TG decreased by nearly 92 % (figure 4C), consistently with the notion of the sustained phase is the result of L-type  $Ca^{2+}$  channels activity.

*TG increases insulin secretion in different glucose concentrations.* In control experiments, when single  $\beta$ -cells are incubated for one hour in the presence of an insulin antiserum with a stimulatory glucose concentration of 15.6 mM, they secreted 2.5-fold more insulin than in the basal glucose in 5.6 mM glucose concentration (figure 5). In these conditions, TG increased individual insulin secretion, by 100 % in both glucose concentrations (table 2). TG also increased the percentage of  $\beta$ -cells that secreted insulin (plaque-forming cells) by 18 % and 34 %, in basal and stimulatory glucose concentrations, respectively. Consequently, TG increases total insulin secretion, given by the insulin secretion index (see Methods), by 2.5-fold in both glucose concentrations with respect to controls (figure 5 and table 2). The cellular mechanism that explains this increment involves the amplification of hormone secretion by individual cells and an increase in the percentage of insulin-secreting cells.

We have previously shown that the L-type channel blocker nifedipine does not affect basal insulin secretion (19). In this study, no difference was found when cells were incubated simultaneously with TG and nifedipine in 5.6 mM glucose (figure 5 and table 2).

We have previously observed that in 15.6 mM glucose, nifedipine decreases insulin secretion index by nearly 60 % (19). In the present study, we have reproduced this result and observed that TG and nifedipine together, decreased insulin secretion index by 41% compared to control cells in 15.6 mM glucose.

In order to estimate the percentage of insulin secretion that is not dependent on L-type channel activation, we subtracted the insulin secretion index in the presence of nifedipine from the value obtained with TG and nifedipine together, and this result was expressed as a percentage of the control index in 15.6 mM glucose. When TG is present, nearly 23 % of the secretion in this high glucose concentration is not dependent on L-type calcium channel activation.

Finally, we found in three different experiments that the insulin secretion index in the complete absence of glucose is  $176 \pm 64$  and  $398 \pm 100$  in control conditions and with TG, respectively ( $p < 0.05$ ). In the absence of glucose in the external solution, only a small percentage of cells secreted enough insulin as to be detected by the RHPA, 21 and 26 % in control and TG, respectively. Compared to the basal glucose concentration (5.6 mM), individual cells secreted nearly 0.5 times less insulin in 0 glucose. However, in the later condition TG increased insulin secretion by 126 %, indicating that TG induced increase is not dependent on glucose presence in the extracellular medium.

## DISCUSSION

In this study we demonstrate that TG potentiates a cationic current ( $I_{cat}$ ) already present in single  $\beta$ -cells under resting conditions.  $I_{cat}$  is mainly carried by  $Na^+$  with a small contribution of  $Ca^{2+}$ . This current depolarizes the membrane, which leads to  $Ca^{2+}$  entry through L-type  $Ca^{2+}$  channels and increased insulin secretion by single rat  $\beta$ -cells.

Several studies have shown the involvement of  $K_{ATP}$  and voltage-dependent channels in the electrical activity of  $\beta$ -cells, however few studies account for the importance of cationic channels in this process. These channels play an important role because they participate in the slow depolarization phase that precedes the fast depolarization and the plateau potential, where action potential firing is observed. Without the presence of this cationic channels, blockade of  $K_{ATP}$  channels would not result in membrane depolarization.

In the first experiments we used TG as a tool to deplete intracellular  $[Ca^{2+}]_i$  stores and observed that TG depolarized the membrane. In this study, we focused in determining the immediate effects of TG on  $\beta$  cells. We found that TG increases the magnitude of a cationic current ( $I_{cat}$ ) already present in  $\beta$ -cells.  $I_{cat}$  increment induces membrane depolarization and the concomitant activation of voltage-gated  $Na^+$  and  $Ca^{2+}$  channels, resulting in action potential firing and calcium influx through nifedipine-sensitive, L-type channels. The final consequence of the activation of  $I_{cat}$  is a marked increment in insulin secretion even at basal glucose concentrations (where  $K_{ATP}$  channels are presumably active).

Other studies have shown the presence of similar cationic currents, mainly permeable to  $Na^+$  that are modulated by the muscarinic agonist carbachol, in mouse pancreatic  $\beta$ -cells and in the insulinoma cell line HIT-T15 (13). Moreover, a similar cationic current activated by maitotoxin (MTX) has been described in mouse pancreatic  $\beta$ -cells (23).

On the other hand, other  $Na^+$  currents activated by maitotoxin and by depletion of intracellular  $Ca^{2+}$  stores, referred to as  $Ca^{2+}$ -release-activated non-selective current ( $I_{CRAN}$ ), have



been described in mouse  $\beta$  cells (18). The depletion of  $\text{Ca}^{2+}$  stores may also induce a sustained, voltage-independent  $\text{Ca}^{2+}$  entry (10, 14), which enhances glucose-induced electrical activity (23, 12) in  $\beta$ -cells.

We also demonstrate that TG induces a slow depolarization and increases electrical activity, maintaining high  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Moreover, when nifedipine was added,  $\text{Ca}^{2+}$  signals decreased even in the continuous presence of TG (figure 4B), indicating the importance of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel activity for the sustained influx of calcium evoked by TG. It is unlikely that TG effects on electrical activity and insulin secretion would be produced by the direct activation of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels because it has been shown that TG does not directly affect L-type  $\text{Ca}^{2+}$  currents in  $\beta$ -cells (9).

It has been previously shown that exposure of islets to TG in 10 mM glucose resulted in increased action potential firing of  $\beta$ -cells (6). However, in this stimulating glucose concentration, TG effect was considered unlikely to be due to the activation of a depolarizing cationic conductance.

A  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent, non-selective cation current, activated by glucagon-like peptide 1 (GLP-1), has been observed in HIT, mouse and human  $\beta$ -cells (7). The GLP1- activated channel is active in the presence of low glucose, which suggests that it could play a role in membrane depolarization (8). Like  $I_{\text{CRAN}}$ , this current is activated by MTX and blocked by SKF96365, but whether or not these currents are identical remains to be determined.

We have previously described that insulin secretion by single  $\beta$ -cells in 15.6 mM glucose is nearly 2.5-fold higher than in 5.6 mM glucose (4). In this study, we observed that acute TG treatment increases insulin secretion in both glucose concentrations. This effect is reflected in two measured parameters:

a) Amplification of insulin secretion by individual cells, because TG increases the plaque area which is proportional to the amount of hormone secreted by the cell, by nearly 100 % in both glucose concentrations.

b) The recruitment of previously silent cells which in control conditions do not secrete a detectable amount of insulin, because in the presence of TG the percentage of insulin-secreting cells increases by 18 % and 34 %, in 5.6 mM and 15.6 mM glucose, respectively.

TG also increases insulin secretion in the absence of glucose in the extracellular medium by 126 % compared to the control. This increment is very similar to that previously observed in single  $\beta$ -cells treated with carbachol in 0 glucose (5).

TG may use different mechanisms to increase insulin secretion. For example, TG could transiently increase  $[Ca^{2+}]_i$  by depleting intracellular  $Ca^{2+}$  stores, however our results suggest that the principal mechanism involved is an increase in the cationic current that leads to membrane depolarization and  $Ca^{2+}$  entry through L-type channels. In fact, the effect of TG on insulin secretion in 5.6 mM glucose is completely abolished by nifedipine, while in 15.6 mM glucose it is only partially inhibited.

We conclude that in basal glucose concentration (5.6 mM), depletion of intracellular  $Ca^{2+}$  stores by TG application increases the activity of a cationic current ( $I_{cat}$ ). The mechanism leading to  $I_{cat}$  activation after depletion of internal  $Ca^{2+}$  stores remains to be identified.

$I_{cat}$  carried mostly by  $Na^+$ , depolarizes the plasma membrane which results in the subsequent activation of voltage-sensitive  $Na^+$  and  $Ca^{2+}$  channels;  $Ca^{2+}$  entry, and as a direct consequence of these actions, insulin secretion (figure 6).

The mechanism leading to cationic channel modulation in normal  $\beta$ -cells remains to be established. However, the properties of the cationic current described here resemble those previously found in the literature for non-selective cationic channels activated upon depletion of intracellular  $Ca^{2+}$  stores (18, 10, 14) and more interestingly, to carbachol-induced cationic currents (13). Since carbachol application would result in inositol triphosphate ( $IP_3$ ) production and release of  $Ca^{2+}$  from internal stores, it is probable that TG could promote similar effects on  $[Ca^{2+}]_i$ , mimicking the effects of carbachol. This could be a plausible mechanism for the modulation of  $I_{cat}$  to control insulin secretion.

**FOOTNOTES**

<sup>1</sup> The following abbreviations were used: TG, thapsigargin;  $[Ca^{2+}]_i$ , intracellular  $Ca^{2+}$  concentration; KATP, ATP-sensitive potassium channel;  $I_{CRAN}$ ,  $Ca^{2+}$ -release-activated non-selective current; ER, endoplasmic reticulum; RHPA, reverse hemolytic plaque assay; NMDG<sup>+</sup>, N-methyl-D-glucamine;  $I_{cat}$ , cationic current modulated by TG; NSCC, non-selective cationic channels; GLP1 glucagon-like peptide 1; IP<sub>3</sub>, inositol triphosphate; MTX, maitotoxin.

**ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Tamara Rosenbaum, Elvira Arellanes and Victor Navarro for proofreading and discussion of this manuscript; and Ana M. Escalante and Francisco Pérez for computing assistance.

**GRANTS**

This work was supported by the grant: D39822 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

## REFERENCES

1. Aguilar-Bryan L and Bryan J. Molecular biology of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *Endocrine Rev* 20: 101-135, 1999.
2. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, and Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 391: 85-100, 1981.
3. Henquin JC, Garcia MC, Bozem M, Hermans MP, and Nenquin M. Muscarinic control of pancreatic B cell function involves sodium-dependent depolarization and calcium influx. *Endocrinology* 122: 2134-2142, 1988.
4. Hiriart M and Ramirez-Medele MC. Functional subpopulations of individual pancreatic B-cells in culture. *Endocrinology* 128: 3193-3198, 1991.
5. Hiriart M and Ramirez-Medele MC. Muscarinic modulation of insulin secretion by single pancreatic beta-cells. *Mol. Cell. Endocrinol* 93: 63-69, 1993.
6. Kanno T, Rorsman P, and Gopel SO. Glucose-dependent regulation of rhythmic action potential firing in pancreatic beta-cells by K(ATP)-channel modulation. *J Physiol* 545: 501-507, 2002.
7. Leech CA and Habener JF. Insulinotropic glucagon-like peptide-1-mediated activation of non-selective cation currents in insulinoma cells is mimicked by maitotoxin. *J Biol Chem* 272: 17987-17993, 1997.
8. Leech CA and Habener JF. A role for Ca<sup>2+</sup>-sensitive nonselective cation channels in regulating the membrane potential of pancreatic beta-cells. *Diabetes* 47: 1066-1073, 1998.

9. Lemmens R, Larsson O, Berggren PO, and Islam MS. Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release from the endoplasmic reticulum amplifies the Ca<sup>2+</sup> signal mediated by activation of voltage-gated L-type Ca<sup>2+</sup> channels in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 276: 9971-9977, 2001.
10. Liu YJ and Gylfe E. Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in insulin-releasing pancreatic beta-cells. *Cell Calcium* 22: 277-86, 1997.
11. Mears D. Regulation of insulin secretion in islets of Langerhans by Ca(2+)channels. *J Membr Biol* 200: 57-66, 2004.
12. Mears D, Sheppard NF Jr, Atwater I, Rojas E, Bertram R, and Sherman A. Evidence that calcium release-activated current mediates the biphasic electrical activity of mouse pancreatic beta-cells. *J Membr Biol* 155: 47-59, 1997.
13. Mears D and Zimlik CL. Muscarinic agonists activate Ca<sup>2+</sup> store-operated and -independent ionic currents in insulin-secreting HIT-T15 cells and mouse pancreatic beta-cells. *J Membr Biol* 197: 59-70, 2004.
14. Miura Y, Henquin JC, and Gilon P. Emptying of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores stimulates Ca<sup>2+</sup> entry in mouse pancreatic beta-cells by both direct and indirect mechanisms. *J Physiol* 503: 387-98, 1997.
15. Navarro-Tableros V, Sanchez-Soto MC, Garcia S, and Hiriart M. Autocrine regulation of single pancreatic beta-cell survival. *Diabetes* 53: 2018-23, 2004.
16. Neill JD and Frawley LS. Detection of hormone release from individual cells in mixed populations using a reverse haemolytic plaque assay. *Endocrinology* 112: 1135-1137, 1983.
17. Ozawa S and Sand O. Electrophysiology of excitable endocrine cells. *Physiol Rev* 66: 887-952, 1986.
18. Roe MW, Worley JF III, Qian F, Tamarina N, Mittal AA, Dralyuk F, Blair NT, Mertz, RJ, Phillipson LH, and Dukes ID. Characterization of a Ca<sup>2+</sup> release-activated nonselective cation current regulating membrane potential and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> oscillations in transgenically derived beta-cells. *J Biol Chem* 273: 10402-10, 1998.

19. Rosenbaum T, Sanchez-Soto MC, and Hiriart M. Nerve growth factor increases insulin secretion and barium current in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 50, 1755-62, 2001.
20. Vaca L. Calmodulin inhibits calcium influx current in vascular endothelium. *FEBS Lett* 390: 289-293, 1996.
21. Vaca L and Sampleri A. Calmodulin modulates the delay period between release of calcium from internal stores and activation of calcium influx via endogenous TRP1 channels. *J Biol Chem* 277: 42178- 42187, 2002.
22. Vidaltamayo R, Sanchez-Soto MC, and Hiriart M. Nerve growth factor increases sodium channel expression in pancreatic beta cells: implications for insulin secretion. *FASEB J* 16: 891-2, 2002.
23. Worley JF III, McIntyre MS, Spencer B, and Dukes ID. Depletion of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores activates a maitotoxin-sensitive nonselective cationic current in beta-cells. *J Biol Chem* 269: 32055-8, 1994.

## FIGURE LEGENDS

Fig. 1. TG activates an inwardly rectifying current in beta cells. Panel A illustrates representative current families elicited by voltage steps from a holding potential of -80 mV (see Experimental procedures section). (1) Cells under control conditions and (2) immediately after 200 nM TG. B, Mean I-V relationships obtained from 9 cells from 4 different experiments, control conditions (solid circles) and after 200 nM TG (open circles).

Fig. 2. The TG-induced current is carried mainly by sodium ions. A, Mean I-V relationships obtained in a  $\text{Na}^+$ -free solution (table 1, 2) under control conditions (solid circles) and after 200 nM TG (open circles). B, Mean I-V relationships obtained with the  $\text{Ca}^{2+}$ -free solution (Table 1,3). C, Mean I-V relationships obtained the extracellular solution  $\text{Na}^+$ - and  $\text{Ca}^{2+}$ -free (Table 1,4). D, Mean peak current obtained at -100 mV for the conditions explained above. Notice the small current obtained with 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$  in the absence of extracellular  $\text{Na}^+$ . In all cases measurements were obtained from at least 20 different cells from 4 different experiments.

Fig. 3. TG depolarizes beta cells. A, current-clamp representative experiment of a single  $\beta$  cell measured with the perforated patch-clamp technique (see Experimental procedures section). At time zero, (indicated by the vertical arrow) 200 nM TG was applied, resulting in a slow depolarization which produced cell action potential firing. B, Average firing frequency before and after TG addition. Values measured from 14 independent cells obtained from 3 different experiments.

Fig. 4. Effect of nifedipine on the TG-induced calcium increment. Single beta cells cultured for 48 h were plated on glass coverslips and loaded with 5  $\mu\text{M}$  Fluo-4-AM as indicated in Experimental



procedures section. Each panel illustrates a representative single cell (upper panels in A and B) obtained at time points indicated by the vertical arrows. A, cells exposed to 200 nM TG under control conditions and B, cells exposed to 200 nM TG in the continuous presence of 5  $\mu$ M nifedipine. Each solid line shown in the lower panels from A and B illustrates the fluorescence increment ( $\Delta F/\Delta F_0$ ) in response to TG from a single cell. C, mean  $\pm$  SD of the fluorescence increment measured at the time point illustrated by the last arrow on A and B. Fluorescence increments induced by the addition of 200 nM TG under control conditions (+Ca<sup>2+</sup>), in the presence of 5 mM EGTA in the bath (Ca<sup>2+</sup>-free) and in the presence of normal extracellular Ca<sup>2+</sup> and 5  $\mu$ M nifedipine (NIF). Measurements obtained from at least 20 different cells from 4 independent experiments.

Fig.5. Effect of TG on insulin secretion by single  $\beta$  cell. Insulin secretion by single  $\beta$  cells was measured with the RHPA (see Experimental procedures section). The overall secretory activity of  $\beta$  cells under a given experimental condition is expressed as a secretion index. C, represents control cells; TG, cells exposed to thapsigargin (200 nM); NIF, cells exposed to nifedipine (5  $\mu$ M). Data are the mean  $\pm$  SEM of four different experiments by duplicate. Symbols denote statistically significant differences (\*) with respect to control cells in 5.6 mM glucose, (†) with respect to TG treated cells in each glucose concentration, (‡) with respect to control cells in 15.6 mM glucose, (§) with respect to cells exposed to nifedipine to 15.6 mM glucose;  $p < 0.05$ .

Fig. 6. Proposed model for TG effect on membrane depolarization and insulin secretion. In basal glucose concentration (5.6 mM), depletion of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores by TG application increases the activity of I<sub>cat</sub>. The mechanism leading to I<sub>cat</sub> activation after depletion of internal Ca<sup>2+</sup> stores remains to be identified (question mark). This current, depolarizes the plasma membrane which results in the subsequent activation of voltage-sensitive Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> channels, Ca<sup>2+</sup> entry, and insulin secretion by pancreatic  $\beta$ -cells.

*Table 1. External Solutions (mM)*

	NaCl	KCl	CaCl <sub>2</sub>	NMDG	Hepes	Glucose	TTX	Other
(1) WCR	115	5	10	-	10	10	100	
(2) WCR	-	5	10	115	10	10	100	
(3) WCR	130	5	0.1	-	10	10	100	
(4) WCR	-	5	0.1	115	10	10	100	
(5) Current clamp and Confocal microscopy	120	4.75	1.8	-	10	5.6	-	1.2 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1.2 Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.05% BSA

pH 7.35, 290-295 mOsm/kg. TTX in nM concentration

*Table 2. Insulin secretion by single  $\beta$ - cells in response to a one-hour incubation with TG in different extracellular glucose concentrations.*

Condition	Glucose (mM)	Plaque-forming cells (%)	Plaque Area ( $\mu\text{m}^2$ )
Control	5.6	44 $\pm$ 2	1391 $\pm$ 124
	15.6	50 $\pm$ 1	2718 $\pm$ 439* <sup>†</sup>
	0	21 $\pm$ 3	839 $\pm$ 308*
TG	5.6	52 $\pm$ 5*	2847 $\pm$ 331*
	15.6	67 $\pm$ 5*	5451 $\pm$ 776 <sup>†</sup>
	0	26 $\pm$ 1.6	1529 $\pm$ 386* <sup>†</sup>
Nifedipine	15.6	34 $\pm$ 3 <sup>†</sup>	1575 $\pm$ 510 <sup>†</sup>
TG + NIF	5.6	40 $\pm$ 7	1292 $\pm$ 133
	15.6	50 $\pm$ 5	1799 $\pm$ 219 <sup>†</sup>

(\* ) Denotes significance level with respect to the control in 5.6 mM glucose;  $p < 0.01$  (<sup>†</sup>) Denotes significance level with respect to the control in 15.6 mM glucose, in both groups;  $p < 0.01$ , ( $n = 4$  experiments by duplicate). +  $n = 3$  experiments by duplicate. Data are the mean  $\pm$  SEM.

Figure 1

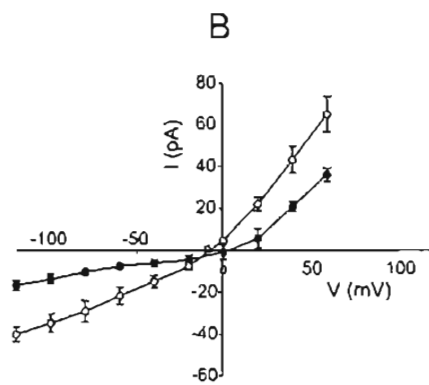
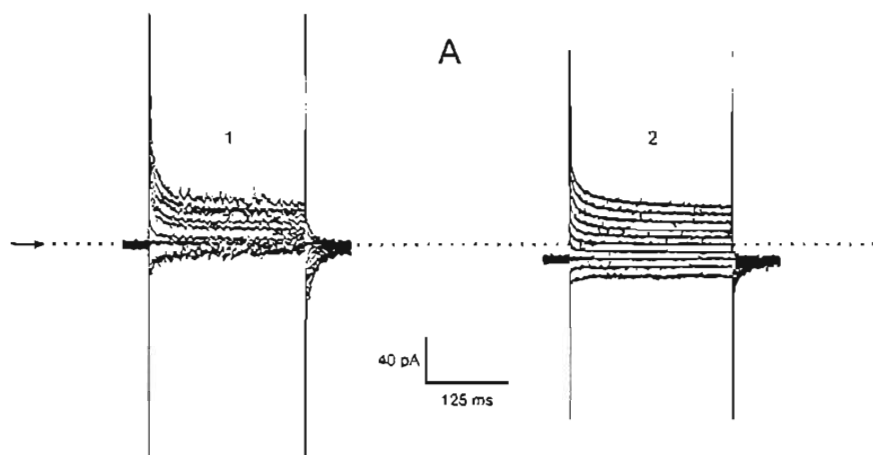


Figure 2

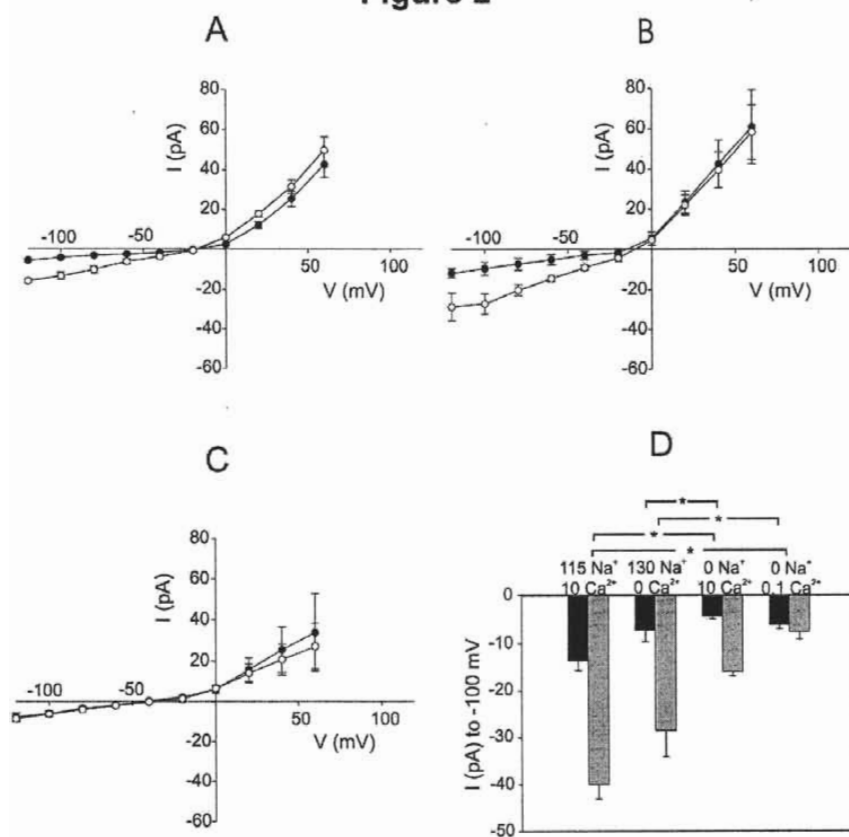


Figure 3

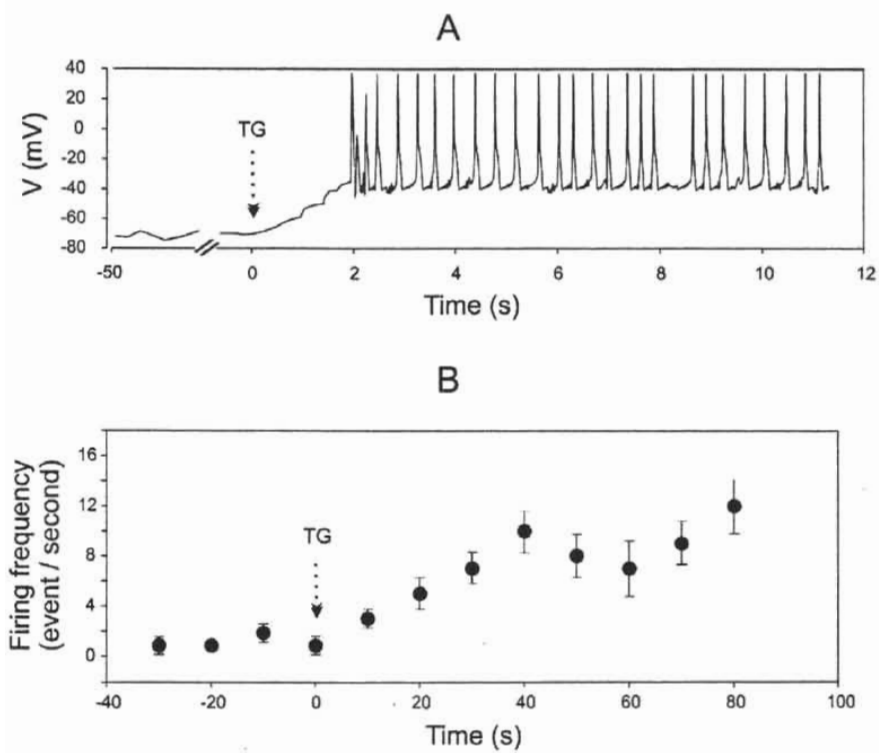


Figure 4

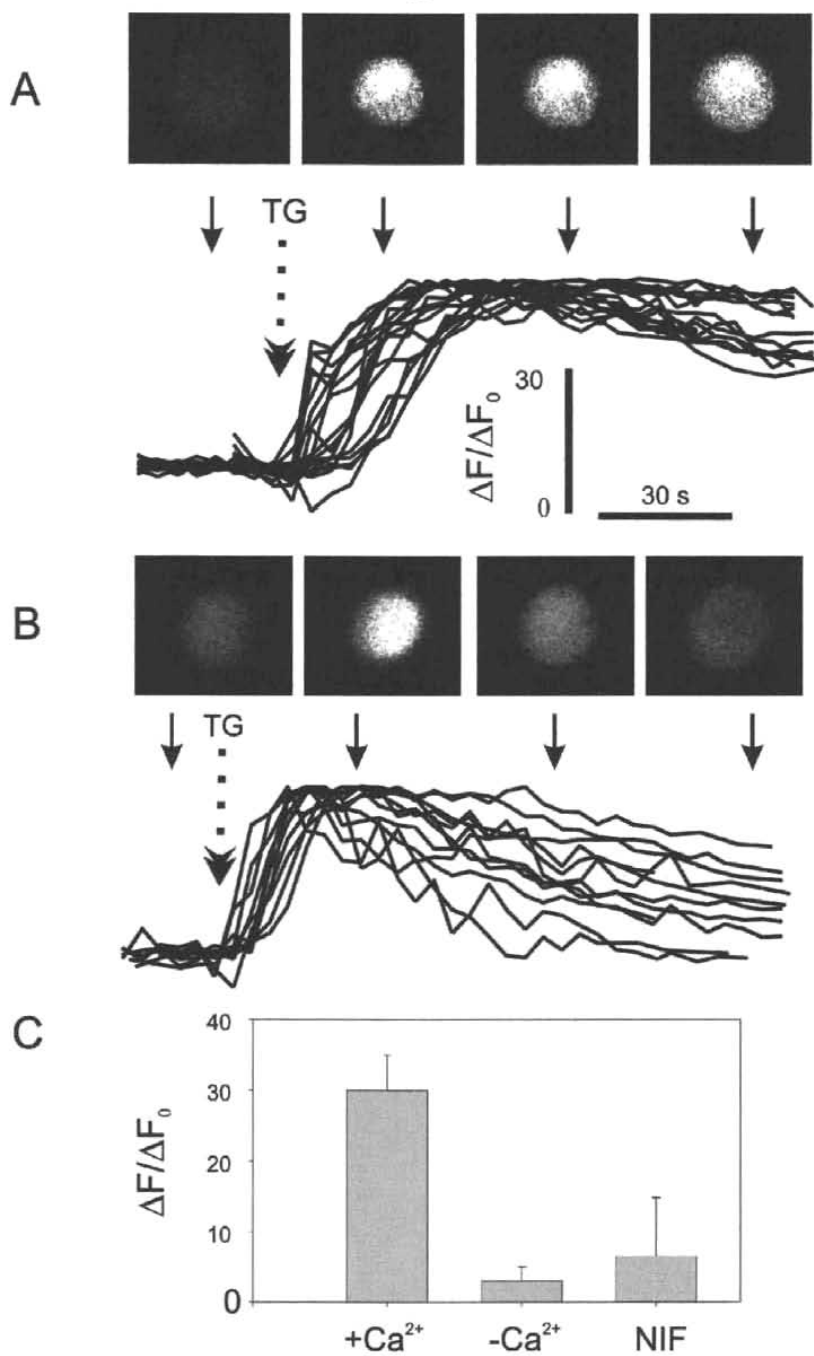


Figure 5

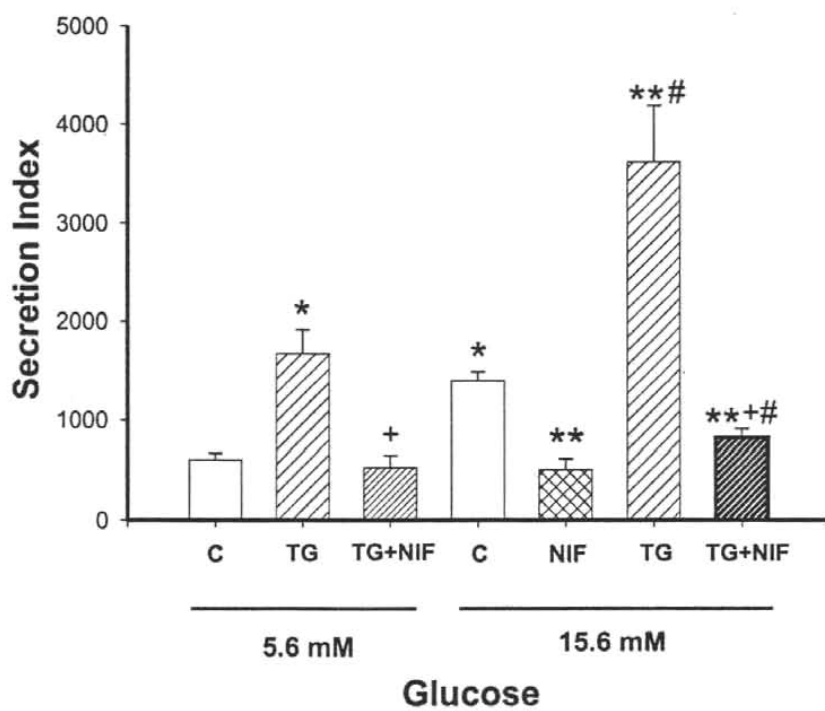




Figure 6

