



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**COMPUESTOS BIOACTIVOS PROCEDENTES DE CNIDARIOS MARINOS CON ACTIVIDAD  
MODULADORA DE LA SECRECIÓN DE INSULINA**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**CARLOS MANLIO DÍAZ GARCÍA**

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARCIA HIRIART URDANIVIA  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. TAMARA LUTI ROSENBAUM EMIR  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM  
DRA. MARÍA LUISA FANJUL PEÑA  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE, 2013.



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



**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**  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**COMPUESTOS BIOACTIVOS PROCEDENTES DE CNIDARIOS MARINOS CON ACTIVIDAD  
MODULADORA DE LA SECRECIÓN DE INSULINA**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**CARLOS MANLIO DÍAZ GARCÍA**

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARCIA HIRIART URDANIVIA  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM  
COMITÉ TUTOR: DRA. TAMARA LUTI ROSENBAUM EMIR  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM  
DRA. MARÍA LUISA FANJUL PEÑA  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE, 2013.



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

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 9 de septiembre de 2013, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno, **DÍAZ GARCÍA CARLOS MANLIO** con número de cuenta **511451263** con la tesis titulada **"COMPUESTOS BIOACTIVOS PROCEDENTES DE CNIDARIOS MARINOS CON ACTIVIDAD MODULADORA DE LA SECRECIÓN DE INSULINA"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. MARCIA HIRIART URDANIVIA:**

Presidente:	DRA. MARTA ALICIA MENJÍVAR IRAHETA
Vocal:	DR. JUAN NÚÑEZ FARFÁN
Secretario:	DRA. TAMARA LUTI ROSENBAUM EMIR
Suplente:	DR. MANUEL MIRANDA ANAYA
Suplente:	DR. RENÉ DE JESÚS CÁRDENAS VÁZQUEZ

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

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 7 de octubre de 2013.

*M. del Coro Arizmendi*

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

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

## **AGRADECIMIENTOS**

**Quisiera expresar mis más sinceros agradecimientos a quienes hicieron posible esta tesis:**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por la oportunidad de continuar creciendo en todos los ámbitos, por brindarme la mano amiga que me mantuvo en el sendero de la ciencia.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México CONACYT (CVU/Becario: 356396/245301), a la Red de Macro Universidades de América Latina y el Caribe, a los proyectos del Instituto de Ciencia y Tecnología del Gobierno del Distrito Federal PICDS08-72, CONACYT FI 60065, CONACYT CB2009-131647, DGAPA-PAPIIT 229407, DGAPA-PAPIIT IN215611 y SDI.PDI. 05.6 Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México por el imprescindible apoyo a la ciencia, por confiar en la juventud y por lo afortunado que fui de aprender en México gracias a estas instituciones.

A la Dra. Marcia Hiriart Urdanivia por sus invaluable enseñanzas, por guiarme y motivarme cada vez más en el campo de la fisiología. Por su amor a la UNAM, por la calidez de su trato y su amistad. Por la confianza que depositó en mí, por el respeto, la consideración y la paciencia que me tuvo. Muchas gracias por contribuir con su ejemplo y su tutoría de excelencia a hacer de mí un mejor profesional y una mejor persona.

A las Dras. miembros de mi comité tutorial, la Dra. Tamara Luti Rosenbaum Emir por su perfecta combinación de rigor y afabilidad. Por su compromiso con la ciencia y por ofrecer su ayuda al más alto nivel en mi formación como científico, tanto académica como éticamente. A la Dra. María Luisa Fanjul Peña por su apoyo y sus oportunas sugerencias, por su estima y su disposición a contribuir siempre de la mejor manera al desarrollo de mi doctorado.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

Agradezco inmensamente a mi familia, sobre todo a mi madre Lourdes García Pérez, quien me enorgullece más que ninguna otra cosa. A mi papá, mis abuelos, tíos y primos, que han hecho también suyos mis sueños y metas. A los que prematuramente dejaron su existencia física pero que continúan impulsándome con su recuerdo, su ejemplo y optimismo.

A María Alejandra Gandini, por el amor, la comprensión y el apoyo incondicional. Por acompañarme en la vida y en la ciencia con la misma pasión. A Andrés Gandini por toda su ayuda, su paciencia y las formidables ilustraciones de mis artículos.

A mis amigos de siempre, cuyo afecto trasciende distancias y tiempos. A esas grandes amistades que hoy también son mi familia.

A mis colegas del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM y de otras instituciones, por sus comentarios y críticas que sin dudas han enriquecido mi estancia en México.

A todos los profesores e investigadores que amablemente han nutrido de saber a generaciones como la mía con su conocimiento y experiencia. A todos aquellos que han contribuido a mi formación y han apoyado mis proyectos en la vida.

A los Doctores Sinodales por la lectura crítica de este manuscrito.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme dado la oportunidad de crecer integralmente, por el privilegio y la responsabilidad de ser un egresado de esta casa de estudios.

A México por haber sido mi casa durante más de 4 años, por la consideración y el trato de hermanos, por haber compartido conmigo su cultura e historia.



## DEDICATORIA

*A mi madre Lourdes García Pérez por su imprescindible amor y su confianza en mí, por darme ánimos en todo momento y disfrutar cada paso de mi vida con el mismo entusiasmo del primero.*

# ÍNDICE

## Resumen

## Abstract

<b>Introducción</b> .....	1
<b>Antecedentes</b> .....	4
Páncreas Endocrino.....	4
Principales acciones de la insulina.....	6
Acoplamiento entre el incremento de la glucosa extracelular y la secreción de insulina.....	6
Canales iónicos presentes en la célula beta y su modulación por toxinas.....	10
Canales que controlan el potencial de membrana en reposo.....	10
Canales de Na <sup>+</sup> activados por voltaje.....	18
Canales de Ca <sup>+2</sup> activados por voltaje.....	21
Liberación de Ca <sup>+2</sup> desde reservorios intracelulares.....	22
Los cnidarios como fuente de toxinas moduladoras de canales iónicos.....	25
Breve reseña de las especies de interés.....	27
<i>Zoanthus sociatus</i> (Ellis, 1767).....	27
<i>Physalia physalis</i> (Linnaeus, 1758).....	28

## **Primera Parte: Efectos de las toxinas de cnidarios marinos sobre la secreción de insulina**

Planteamiento del problema.....	30
Hipótesis.....	31
Objetivo General.....	31

Objetivos Específicos.....	31
<b>Materiales y métodos generales para todos los problemas de estudio....</b>	<b>33</b>
Reactivos.....	33
Colecta del material biológico.....	34
Preparación del extracto crudo.....	34
Electroforesis SDS-PAGE.....	35
Procedimientos de purificación.....	35
Tabla de purificación.....	36
Espectrometría de masas.....	37
Secuenciación del extremo N-terminal.....	38
Animales de experimentación.....	38
Índices morfométricos.....	39
Cultivo de células beta pancreáticas.....	40
Ensayo Hemolítico Inverso.....	41
Viabilidad celular.....	42
Mediciones de Ca <sup>2+</sup> intracelular.....	43
Electrofisiología.....	44
Soluciones de registro.....	46
Medición de la insulina plasmática.....	46
Prueba de tolerancia intraperitoneal a la glucosa.....	47
Prueba de tolerancia intraperitoneal a la insulina.....	47
Análisis de datos.....	47
<b>Resultados.....</b>	<b>49</b>
Efecto del extracto crudo de <i>Z. sociatus</i> sobre la secreción de insulina.....	49
Obtención de la fracción de bajo peso molecular a partir del extracto crudo de <i>Z. sociatus</i> .....	51

Efecto de la fracción de bajo peso molecular de <i>Z. sociatus</i> sobre la secreción de insulina.....	53
La fracción de bajo peso molecular de <i>Z. sociatus</i> inhibe el incremento del Ca <sup>2+</sup> intracelular en respuesta a la glucosa.....	55
La fracción de bajo peso molecular de <i>Z. sociatus</i> inhibe el incremento del Ca <sup>2+</sup> intracelular en respuesta a la despolarización con KCl.....	55
La fracción de bajo peso molecular de <i>Z. sociatus</i> causa intolerancia a la glucosa <i>in vivo</i> .....	58
Análisis electroforético del extracto crudo de <i>Physalia physalis</i> .....	59
El extracto crudo de <i>Physalia physalis</i> reduce los niveles de glucosa <i>in vivo</i> .....	61
Purificación de toxinas de <i>Physalia physalis</i> , orientada mediante el RHPA.....	63
Las toxinas de <i>Physalia physalis</i> incrementan el porcentaje de células secretoras.....	68
Las toxinas de <i>Physalia physalis</i> incrementan el calcio intracelular.....	71
Caracterización bioquímica de las toxinas de <i>Physalia physalis</i> .....	72
<b>Discusión</b> .....	75
Efectos del extracto crudo y la fracción de bajo peso molecular de <i>Zoanthus sociatus</i> sobre las células beta pancreáticas.....	75
Efectos del extracto crudo y la fracción de bajo peso molecular de <i>Physalia physalis</i> sobre las células beta pancreáticas.....	81
<b>Conclusiones</b> .....	85
 <b>Segunda Parte: Papel del canal TRPV1 en la secreción de insulina</b>	
Planteamiento del problema.....	87

Hipótesis.....	89
Objetivo General.....	89
Objetivos Específicos.....	89
<b>Resultados</b> .....	90
Las células beta pancreáticas no expresan canales TRPV1 funcionales.....	90
La capsaicina no activa canales TRPV1 en células beta de ratas neonatas....	93
El canal TRPV1 no es funcional en la línea celular RINm5F.....	95
La ausencia del canal TRPV1 no afecta la secreción de insulina estimulada por glucosa.....	97
Los ratones <i>Trpv1<sup>-/-</sup></i> presentan una mayor sensibilidad a la insulina respecto a los ratones WT.....	101
La sensibilidad a la insulina de los ratones <i>Trpv1<sup>-/-</sup></i> no se potencia por el bloqueo de los receptores beta adrenérgicos.....	106
<b>Discusión</b> .....	109
<b>Conclusiones</b> .....	116
<b>Bibliografía</b> .....	117
<b>Anexos</b> .....	132

## RESUMEN

Los cnidarios pertenecen a un filo de animales acuáticos que producen toxinas con actividades citolíticas, neurotóxicas y cardiotoxinas, cuyos efectos no se han estudiado en la secreción de insulina. Muchas de estas toxinas afectan canales iónicos presentes en las neuronas y los cardiomiocitos que también se expresan en las células beta pancreáticas y participan en la secreción de insulina, de ahí nuestro interés por estudiar el efecto de los venenos de cnidarios en este proceso. En el presente trabajo nos propusimos estudiar los efectos de los extractos crudos de los cnidarios marinos *Zoanthus sociatus* y *Physalia physalis*, así como sus fracciones de bajo peso molecular sobre la secreción de insulina estimulada por glucosa. En el presente estudio se demuestra por primera vez que los extractos de cnidarios pueden modular la secreción de insulina. Sin embargo, dichas toxinas exhibieron una gran variabilidad tanto en su naturaleza como en su actividad.

En la fracción de bajo peso molecular de *Zoanthus sociatus*, que tuvo un efecto inhibitorio sobre la secreción de insulina, se detectaron compuestos con pesos moleculares similares a los de las neurotoxinas de cnidarios (2-7 kDa). El mecanismo responsable de la reducción en la respuesta a la glucosa de las células beta pancreáticas incluye un efecto sobre los canales de  $Ca^{2+}$  sensibles a voltaje. El grado de inhibición causado por esta fracción de bajo peso molecular es lo suficientemente potente para causar intolerancia a la glucosa (2 g/kg) *in vivo*.

Por otra parte, se demostró que el veneno proveniente de los tentáculos de *Physalia physalis* potencia la secreción de insulina. Se identificaron dos toxinas de bajo peso molecular con actividad potenciadora de la secreción de insulina (PpV9.4 de 550.7 Da y PpV19.3 de 4720.9 Da), cuyas estructuras no son compatibles con las de las neurotoxinas peptídicas de cnidarios ya conocidas. Además, estas toxinas incrementan la excitabilidad de las células beta independientemente de los canales sensibles a voltaje. Interesantemente, se ha descrito que los extractos de *P. physalis* sensibilizan a los canales TRPV1, los cuales se han asociado a la secreción de insulina aunque su papel en esta aún no había sido dilucidado completamente.

Una vez que fueron publicados los hallazgos correspondientes a los estudios realizados con las toxinas de cnidarios abordamos una nueva pregunta. Así, decidimos estudiar el papel del canal TRPV1 sobre la secreción de insulina. Para estudiar esto se realizaron experimentos electrofisiológicos y de imagenología de  $\text{Ca}^{2+}$  con los cuales se determinó que el canal TRPV1 no se expresa funcionalmente ni en los cultivos primarios de células beta pancreáticas ni en la línea celular de insulinoma RINm5F. La ausencia del canal TRPV1 no afecta la secreción de insulina basal, ni la estimulada por alta glucosa, indicando que el canal TRPV1 no desempeña un papel determinante en la respuesta a la glucosa de las células beta pancreáticas, pese a que ha habido controversia acerca de su papel en la función de estas células ya que se ha sugerido que puede influenciar la secreción de insulina.

Sin embargo, se pudo apreciar que los ratones *Trpv1<sup>-/-</sup>* mostraron una mayor sensibilidad a la insulina respecto a los WT, lo que pudiera compensar los niveles disminuidos de insulina en estos animales. La administración de propranolol causó una elevación de los niveles de glucosa plasmática en los animales en ayunas, lo cual pudiera deberse al bloqueo de los receptores beta-2 adrenérgicos en las células beta. No obstante el efecto más notable fue que el propranolol redujo significativamente los niveles de glucosa en las curvas de tolerancia a la insulina en los ratones WT, pero no en los animales *Trpv1<sup>-/-</sup>*, lo que significa que en estos últimos el bloqueo de los receptores beta adrenérgicos en los tejidos periféricos no causa un aumento en la sensibilidad a la insulina.

El presente estudio demuestra que el canal TRPV1 no es funcional en las células beta pancreáticas y evidencia la participación de este en la regulación de la sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos mediante la interacción de las fibras sensoriales positivas a TRPV1 y el tono adrenérgico. De acuerdo a los resultados obtenidos, se propone que aunque el canal TRPV1 no participa intrínsecamente en la fisiología beta pancreática, pudiera ser relevante para comprender algunas de las complicaciones características de la diabetes mellitus, sobre todo relacionadas con las neuropatías autonómicas.



## ABSTRACT

Cnidarians comprise a taxon with a high biodiversity of cytotoxic, neurotoxic and cardiotoxic compounds, whose effects on insulin release have not been studied. We tested the effect of a crude extract of *Zoanthus sociatus* and the low molecular weight fraction of this extract on insulin secretion in isolated rat beta-cells and also in a glucose tolerance test in vivo. We observed that the extract inhibited insulin release by reducing the amount of this hormone secreted by individual beta-cells and also by silencing a fraction of the secreting population. This effect coincided with a diminished rise in intracellular  $Ca^{2+}$  in response to high glucose and high  $K^+$  -induced depolarization. Moreover, intraperitoneal administration of the low molecular weight fraction produced glucose intolerance in adult rats. The active fraction exhibited molecular weights similar to the neurotoxins described in the phylum. Our results broaden the knowledge on the toxic effects of cnidarian venoms and evidence potential modulators of voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels in this group.

A tentacle-only extract from *Physalia physalis* was analyzed for insulin secretion. This is a marine cnidarian from which high molecular weight toxins with hemolytic and neurotoxic effects have been isolated. In the present work, two novel toxins, PpV9.4 and PpV19.3 were purified from *P. physalis* by bioactive guideline isolation. The molecular weights were 550.7 and 4720.9 Da for PpV9.4

and PpV19.3, respectively. Edman sequencing results yielded a structure for these toxins that included the presence of modified amino acids. Both toxins increased the percentage of insulin secreting beta-cells and induced cytosolic  $Ca^{2+}$  elevation. To date, this is the first report to show that low molecular weight toxins purified from cnidarians increase insulin secretion, providing a new approach to the study of beta-cells physiology. Interestingly, it has been reported that *P. physalis* extracts sensitize TRPV1 channels, which have been proposed to be present in beta cells.

Transient receptor potential channels have been put forward as regulators of insulin secretion. The role for TRPV1 has not been evidenced in beta cells from primary cultures. Here, we also explored whether TRPV1 is functionally expressed in cultures of beta cells from neonate and adult rats. Using a combination of fluorescent and electrophysiological techniques we examined if capsaicin could increase the intracellular  $Ca^{2+}$  or activate cationic non-selective currents. Our results show that TRPV1 channels are not functional in insulin-secreting cells. We then wondered if nerve growth factor could induce expression of TRPV1 in beta cells from newborn rats and RINm5F cells but we failed to observe changes in TRPV1 function in either case. Nonetheless, by examining *Trpv1*<sup>-/-</sup> mice we observed that these animals presented lower fasting insulin levels than their wild-type C57BL/6J littermates, although the glucose tolerance test indicated no differences between both experimental groups. Moreover, no differences were observed in insulin secretion from *Trpv1*<sup>-/-</sup> mice

beta cells in response to basal (5.6 mM) or high glucose (15.6 mM) and KCl (40 mM) as compared to the wild-type animal cells. Thus, we decided to explore how the beta-adrenergic tone in the *Trpv1*<sup>-/-</sup> mice was affected in a systemic response to propranolol. Propranolol increased insulin sensitivity in wild-type animals, but did not cause a further reduction in the insulin tolerance curve of *Trpv1*<sup>-/-</sup>. Our data show that TRPV1 does not contribute to glucose-induced insulin secretion in beta cells, but rather contributes to the adrenergic control of insulin sensitivity.

## INTRODUCCIÓN

La secreción de insulina estimulada por glucosa es un proceso esencial en la homeostasis de la glucosa y para el metabolismo energético en general. El funcionamiento incorrecto de las células beta pancreáticas conlleva al desarrollo de la diabetes mellitus, una enfermedad epidémica a nivel global con una elevada incidencia en México (Barquera et al., 2013). Por tanto, la comprensión exhaustiva de los mecanismos implicados en el proceso de secreción de insulina, así como la búsqueda de agentes específicos que puedan modularlos, contribuirían al diseño de nuevas estrategias terapéuticas. Nuestro laboratorio ha acumulado una gran experiencia en el estudio de la regulación de la secreción de insulina por diversos agentes endógenos, fundamentalmente el factor de crecimiento neuronal.

Recientemente nos hemos interesado por encontrar nuevos compuestos bioactivos aislados de organismos venenosos que modulen la secreción de insulina. Actualmente existen miméticos de toxinas animales que se estudian en fases clínicas o incluso se emplean en el tratamiento de patologías como el dolor crónico (Williams et al., 2008), las enfermedades autoinmunes (Chi et al., 2012) o la propia diabetes mellitus (Furman, 2012). Por otra parte, los fármacos moduladores de la secreción de insulina pudieran aplicarse como herramientas moleculares para el estudio de las células beta.

Particularmente, nos interesó el filo Cnidaria de animales acuáticos, el cual se caracteriza por ser altamente venenoso y en donde se han descrito toxinas de bajo peso molecular capaces de modular a los canales iónicos que subyacen a la actividad eléctrica de varios tejidos excitables. A este interés inicial se suman la enorme biodiversidad del grupo y la escasez de estudios relacionados con sus efectos *in vivo* (Suput, 2009), en especial sobre el sistema endocrino. Así, se estudiaron los efectos de extractos procedentes de dos cnidarios marinos (*Zoanthus sociatus* y *Physalia physalis*), los cuales se evaluaron sobre la secreción de insulina en células beta aisladas y sobre la tolerancia a la glucosa *in vivo*. Interesantemente, se detectó una actividad moduladora de la secreción de insulina en ambas especies, lo que constituye un nuevo efecto *in vivo* en los venenos del grupo. No obstante, es de destacar que los mecanismos resultaron diferentes, lo cual ilustra el potencial aún no agotado de compuestos bioactivos en el filo.

En una segunda sección de esta tesis se presentarán los resultados acerca de la funcionalidad en las células beta del canal TRPV1. Este canal, coincidentemente, se ha propuesto como blanco molecular de los venenos de algunos cnidarios. Sin embargo, su papel en la secreción de insulina ha sido controversial y no totalmente claro. Nuestros resultados apoyan el hecho de que no existen canales TRPV1 funcionales en la célula beta, pues no se observó actividad alguna tras la aplicación de su agonista capsaicina, ni hubo cambios en la secreción de insulina en células beta de ratones carentes de este canal. En este trabajo demostramos además que si

bien el canal no es intrínsecamente relevante para la célula beta, sí participa en la homeostasis de la glucosa mediante la regulación de la resistencia periférica a la insulina.

## **ANTECEDENTES**

### **Páncreas endocrino**

El páncreas es una glándula de origen endodérmico que en la etapa madura se divide morfofuncionalmente en dos partes: la cabeza (más cercana al intestino delgado) y el cuerpo más la cola. Alrededor del día 9 embrionario en roedores, surgen dos yemas pancreáticas que luego actúan como precursoras de ambos lóbulos del páncreas, las cuales geman a partir de las superficies ventral y dorsal del intestino anterior, muy cerca del endodermo hepático. En las siguientes 36 horas evaginan hacia el mesénquima circundante y se ubican entre el estómago y el intestino. La rotación de este último en el día 12.5 aproxima a ambos lóbulos y desde este punto hasta el nacimiento del animal ocurren procesos de fusión lobular, crecimiento y diferenciación celular (Murtaugh, 2007).

Durante la ontogenia del páncreas, las células insulares maduras se derivan de un subconjunto de células progenitoras que expresan los factores de transcripción Pdx1 y/o Ptf 1a, y además el Ngn 3 (Murtaugh, 2007). El desarrollo del islote pancreático maduro requiere además la asociación entre los diferentes tipos celulares endocrinos, la formación de la capa de colágena alrededor del islote, la red vascular y la inervación autónoma (Cabrera-Vasquez et al., 2009).

El páncreas en la etapa adulta es una glándula mixta con una porción exocrina constituida por el tejido acinar y una porción endocrina formada por los islotes

pancreáticos. Las células acinares secretan enzimas hidrolíticas que al ser vertidas en el intestino delgado participan en la digestión de los alimentos. Los islotes pancreáticos son cúmulos cuasi esféricos heterogéneos de células secretoras de hormonas, delimitados por una capa de colágena tipo IV, que constituyen del 2 al 3% aproximadamente del tejido total del páncreas.

Hasta el momento se han descrito cuatro tipos celulares en los islotes pancreáticos de mamíferos adultos: las células alfa, beta, delta y PP, cuyas hormonas características son el glucagon, la insulina, la somatostatina y el polipéptido pancreático respectivamente (Youos, 2011). Los islotes pancreáticos son además estructuras ampliamente vascularizadas e inervadas por ambas ramas del sistema nervioso autónomo y el sistema sensorial (Cabrera-Vasquez et al., 2009). La arquitectura de los islotes y la proporción en que aparecen los diferentes tipos celulares varían entre especies e incluso durante la ontogenia de cada una de ellas.

En islotes de roedores las células predominantes son las de tipo beta (aproximadamente en un 80 %), las cuales se distribuyen hacia el centro del islote fundamentalmente. Hacia la periferia se ubican con mayor frecuencia las de tipo alfa, que constituyen el segundo tipo celular más abundante. Las células beta secretan insulina, la única hormona hipoglucemiante descrita, que además ejerce efectos tróficos en muchos tejidos diana en el organismo.



## **Principales acciones de la insulina**

La insulina es una proteína relativamente pequeña, con un peso de alrededor de 6 kDa, que es producida y secretada por las células beta de los islotes pancreáticos. Está formada por dos cadenas A y B, unidas entre sí por puentes disulfuro. Es almacenada en gránulos y secretada por exocitosis.

Los efectos inmediatos de la insulina son promover el transporte de glucosa hacia el interior de las células del tejido muscular esquelético y adiposo, y promover el almacenamiento de la glucosa en forma de glucógeno, fundamentalmente en hígado y músculo. También estimula a que el exceso de glucosa sea transformado en ácidos grasos, en el hígado, y que estos sean transformados a triglicéridos y transportados en lipoproteínas al tejido adiposo. Entre sus efectos anabólicos también se encuentra la inhibición de la gluconeogénesis hepática y el aumento en la captación de aminoácidos y la síntesis proteica. La insulina presenta además efectos tróficos en prácticamente todos los tejidos, donde promueve la supervivencia celular (Barrett, 2012).

## **Acoplamiento entre el incremento de la concentración de glucosa extracelular y la secreción de insulina**

El aumento de la concentración extracelular de glucosa induce la secreción de insulina por las células beta pancreáticas. En el acoplamiento entre el estímulo y la

secreción es importante tanto el incremento absoluto del nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, como de la frecuencia de sus oscilaciones, las cuales están correlacionadas con la actividad eléctrica de estas células. La fase metabólica de este proceso comienza con la entrada del azúcar a través de la membrana mediante transportadores tipo GLUT2 y su posterior catabolismo oxidativo. El consecuente aumento en la relación ATP/ADP inicia la fase iónica, debido a que promueve el cierre de canales de  $\text{K}^+$  sensibles a ATP ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ ), principales responsables del potencial de membrana en reposo (aproximadamente -70 mV). De esta forma se favorece la despolarización de la membrana por corrientes catiónicas no selectivas (CAN) hasta activarse los canales sensibles a voltaje. La identidad y el papel fisiológico de las CAN se han asociado a miembros de la familia de canales del tipo Receptor de Potencial Transitorio (TRP, según sus siglas en inglés).

Las corrientes a través de los canales de  $\text{Na}^+$  ( $\text{Nav}$ ) y  $\text{Ca}^{2+}$  (tipo T) sensibles a voltaje causan un desplazamiento abrupto del potencial de membrana hacia valores más positivos, que a su vez permite la activación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de alto umbral ( $\text{Cav}$ ; fundamentalmente de tipo L), los cuales mantienen una fase de meseta en la que se superponen espigas de potenciales de acción. Finalmente, el potencial de membrana se desplaza a valores más negativos por la apertura de canales de  $\text{K}^+$  activados por voltaje ( $\text{Kv}$ ) o por  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{K}_{\text{Ca}}$ ), cuyo complejo balance genera un patrón oscilatorio del voltaje transmembranal que se correlaciona con la secreción de insulina (Henquin and Meissner, 1984; Hiriart and Aguilar-Bryan, 2008).

La secreción de insulina está finamente regulada por un conjunto de secretagogos endógenos, hormonas y factores de crecimiento tales como acetilcolina, glucagon (Ashcroft and Rorsman, 1989) y el factor de crecimiento neuronal (NGF, según sus siglas del inglés). Se conoce que la estimulación parasimpática promueve la secreción de insulina mientras que por el contrario, el efecto neto de la rama simpática, es el de disminuir los niveles de insulina en plasma (Rodríguez-Díaz and Caicedo, 2013). El efecto potenciador de la secreción de insulina que ejerce el neurotransmisor parasimpático acetilcolina se debe fundamentalmente a receptores muscarínicos M3, los cuales activan a la fosfolipasa C y causan una elevación del  $Ca^{2+}$  intracelular o activan directamente a canales iónicos que despolarizan la membrana (Kong and Tobin, 2011; Swayne et al., 2009). Las células beta pancreáticas presentan además dos tipos fundamentales de receptores adrenérgicos, los de tipo beta que aumentan la actividad de la adenilato ciclasa y la proteína cinasa A (PKA, según sus siglas en inglés), por lo cual potenciaría la secreción de insulina, y los alfa-2 que inhiben la secreción de insulina y cuyo efecto predomina.

Por otra parte, las células beta pancreáticas secretan NGF (Rosenbaum et al., 1998) y expresan receptores de alta (TrkA) y de baja afinidad (p75) para esta neurotrofina (Polak et al., 1993), la cual ejerce importantes efectos autocrinos. Algunos de estos efectos incluyen cambios morfológicos como la extensión de procesos similares a neuritas y el aumento de la supervivencia y excitabilidad celular.

En particular, el papel regulador del NGF sobre los canales iónicos ha sido estudiado por nuestro grupo de trabajo.

Se ha demostrado que el tratamiento a largo plazo con NGF incrementa la síntesis de canales de  $\text{Na}^+$  activados por voltaje y en consecuencia la secreción de insulina (Vidaltamayo et al., 2002). También se ha descrito que las corrientes a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L se potencian de una manera dependiente de TrkA, presumiblemente por las acciones combinadas de un incremento en la densidad de canales en la membrana y un aumento de su actividad. El NGF también mejora la respuesta a la glucosa en las células beta de ratas neonatas, a través del aumento en la densidad de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a voltaje en la membrana (Navarro-Tableros et al., 2007a). Además, se ha sugerido que el NGF guía la inervación simpática en el islote pancreático durante el desarrollo (Cabrera-Vasquez et al., 2009).

Algunas hormonas intestinales causan efectos tróficos y modulan la secreción de insulina en función de la ingesta de nutrientes. Algunos ejemplos notables son el péptido-1 similar al glucagón (GLP-1 según sus siglas en inglés *glucagon-like peptide-1*) y el polipéptido con acción dependiente de glucosa sobre la liberación de insulina (GIP, según sus siglas en inglés). El GLP-1 y el GIP se conocen como incretinas pues son los responsables de que la secreción de insulina en respuesta a la glucosa administrada oralmente sea mayor que cuando una misma dosis es inoculada de forma intravenosa. Además, estas incretinas no sólo potencian la secreción de

insulina, sino que disminuyen la apoptosis y promueven la proliferación de las células beta (Phillips and Prins, 2011).

## **Canales iónicos presentes en la célula beta y su modulación por toxinas**

### **Canales que controlan el potencial de membrana en reposo**

Recientemente la identidad de los canales responsables de la corrientes catiónicas no selectivas se ha asociado a varios miembros de la familia de canales TRP (Islam, 2011). En mamíferos, estos canales iónicos se agrupan en seis subfamilias: canónica (C), vainiloide (V), ankirina (A), melastatina (M), policistina (PP) y mucolipina (ML) (Venkatachalam and Montell, 2007). Estos canales comparten una estructura tetramérica con seis segmentos transmembranales en cada subunidad (Li et al., 2011), de manera similar a los canales de  $K^+$  activados por voltaje. Además, excepto los canales TRPM4 y TRPM5, el resto conduce cationes divalentes aunque difieren entre sí en las permeabilidades relativas respecto a cationes monovalentes (Owsianik et al., 2006).

Otra característica notable de los canales TRP es que se comportan como receptores polimodales, pues responden a la temperatura, el pH, el estrés mecánico y a la unión de ligandos tanto endógenos como exógenos (Nieto-Posadas et al., 2011). Además, muestran cierta activación por voltaje con relaciones corriente a

voltaje variables, aunque es común observar rectificación saliente en estas (Clapham et al., 2003; Nilius et al., 2005).

La participación de los canales TRP en la homeostasis de la glucosa ha sido objeto de mucha atención en la última década. La expresión de varios miembros de esta familia ha sido descrita en líneas celulares y cultivos primarios de células beta, mientras que las evidencias derivadas de experimentos con ratones *knockout* indican que al menos TRPM2 y TRPM5 tienen un papel clave en el proceso de secreción de insulina estimulada por glucosa (Colsoul et al., 2011). TRPM2 por ejemplo, es activado por especies reactivas del oxígeno como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lo cual vincula el estado redox de las células con la despolarización membranal, la movilización de Ca<sup>2+</sup> desde reservorios intracelulares y la viabilidad celular (Ishii et al., 2006; Lange et al., 2009). Además, este canal es activado por GLP-1 a través de fosforilaciones mediadas por PKA, lo cual promueve la entrada de Ca<sup>2+</sup> y la secreción de insulina (Uchida et al., 2011; Uchida and Tominaga, 2011c). Interesantemente, aunque los ratones TRPM2<sup>-/-</sup> presentan niveles de insulina reducidos, también exhiben un mayor gasto energético y una menor propensión a desarrollar obesidad y resistencia a la insulina (Zhang et al., 2012).

Por su parte, el canal TRPM5 se ha descrito como un determinante en las oscilaciones de Ca<sup>2+</sup> en las células beta de ratón (Colsoul et al., 2010). La ausencia de este canal afecta el acoplamiento entre el aumento de la glucosa extracelular y la

secreción de insulina, y ocasiona que los ratones adultos manifiesten intolerancia a la glucosa (Brixel et al., 2010; Colsoul et al., 2010). Además, el canal TRPM5 funciona como un mediador entre la liberación de insulina y los niveles circulantes de fructosa debido a la expresión de receptores al sabor dulce en el páncreas (Kyriazis et al., 2012) y en las células intestinales secretoras de GLP-1 (Colsoul et al., 2011). La activación de estos receptores inducen un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, que a su vez activa al canal TRPM5, acentúa la despolarización de la membrana y promueve una mayor secreción hormonal.

Su pariente cercano, el canal TRPM4, no parece ser tan relevante en la fisiología de la célula beta en ratones, pues los animales *knockout* para este canal presentan una tolerancia a la glucosa similar a los de fenotipo silvestre (Vennekens et al., 2007). Sin embargo, en insulinomas y cultivos primarios de células beta de rata existen evidencias de la presencia de corrientes iónicas similares a las que ocurren a través del TRPM4 (Marigo et al., 2009). Se ha demostrado también que este canal funciona como un vínculo entre la señalización por arginina-vasopresina y la secreción de insulina, pues la expresión de una construcción dominante negativa de TRPM4 previene el efecto estimulante de la hormona pituitaria (Cheng et al., 2007).

Otro de los miembros de la familia melastatina relacionado con las células beta es el TRPM3, un receptor a esteroides que puede ser activado por sulfato de pregnenolona (Wagner et al., 2008) y participar en los flujos de  $\text{Zn}^{2+}$  (Wagner et al.,

2010). Además, este canal puede ser activado por esfingolípidos (Grimm et al., 2005), cuyos niveles se incrementan en la obesidad, la inflamación y el síndrome metabólico (Brozinick et al., 2012; Majumdar and Mastrandrea, 2012; Othman et al., 2012).

Recientemente, el canal TRPA1 ha sido detectado en la línea celular RINm5F, así como en células beta aisladas de rata. La activación de este canal incrementa la secreción de insulina independientemente de los canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a voltaje y funciona como un sensor del estrés oxidativo en la célula beta (Cao et al., 2012). Además, TRPA1 es activado por ácidos grasos, cuyas potencias se incrementan en función del largo de sus cadenas y el número de insaturaciones (Motter and Ahern, 2012).

Asimismo, la expresión de canales TRP canónicos ha sido observada en varios modelos de células secretoras de insulina (Li and Zhang, 2009; Qian et al., 2002; Sakura and Ashcroft, 1997). A pesar de que sus funciones específicas en la secreción de insulina no se han dilucidado completamente, las alteraciones en su actividad se asocian con algunos síntomas de disfunción metabólica (como la obesidad, la hipertensión y las dislipidemias) o incluso la diabetes mellitus (Graham et al., 2012; Zhu et al., 2011).

Los miembros 1, 2 y 4 de la familia vainiloide también han sido relacionados con la fisiología de las células beta pancreáticas. El papel del canal TRPV1 en la



secreción de insulina era un punto controversial al término de esta tesis, pues si bien se habían descrito algunos indicios de su activación en ciertos insulinomas, no había sido posible su activación en células beta nativas de ratas y humanos (Akiba et al., 2004; Jabin Fagelskiold et al., 2012). Sin embargo, otros trabajos han propuesto que su actividad en las fibras sensoriales pudiera regular la secreción de insulina y la inflamación en el islote, así como la resistencia a la insulina (Gram et al., 2007; Razavi et al., 2006). Los mecanismos que subyacen a este último punto pudieran explicar, por ejemplo, que los ratones carentes de TRPV1 no presenten un deterioro severo de la tolerancia a la glucosa, y que sean además resistentes a la obesidad y la hipertensión inducidas por una dieta alta en grasa (Marshall et al., 2012).

Por otra parte, la presencia del canal TRPV2 en la línea celular MIN6, así como el incremento de la densidad de estos canales inducido por la propia insulina, sugieren un posible papel en los efectos autocrinos que ejercen las secreciones de las células beta sobre sí mismas (Aoyagi et al., 2010; Hisanaga et al., 2009). El canal TRPV4, que también ha sido estudiado en las células MIN6 y en páncreas de ratón, también responde a una hormona liberada por las células beta, la amilina o polipéptido amiloide del islote. Sin embargo, la activación de TRPV4 por la amilina y la entrada exacerbada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de este canal se han relacionado con el estrés en el retículo endoplasmático y la citotoxicidad en las células beta (Casas et al., 2008).

En resumen, la participación de los canales TRP en la fisiopatología de las células beta pancreáticas permite integrar numerosas señales autocrinas o provenientes de otros tipos celulares (Diaz-Garcia et al., 2013; Uchida and Tominaga, 2011b), pero también regulan la respuesta a la insulina en otros tejidos y por tanto la homeostasis de la glucosa y la propensión a enfermedades metabólicas (Liu et al., 2008). Precisamente la versatilidad y la relevancia fisiológica de los canales TRP los hace un blanco terapéutico atractivo, aunque su promiscuidad farmacológica demanda la búsqueda de fármacos más específicos.

Se ha descrito que la administración subcutánea de capsaicina (10 mg/kg), un compuesto bioactivo del género de chiles *Capsicum* que activa el canal TRPV1 y que causa la sensación picante de estos alimentos, incrementa los niveles de insulina en ratas (Akiba et al., 2004). Este canal es activado también por las vainilotoxinas, péptidos aislados de la tarántula *Psalmopoeus cambridgei*, cuyas actividades son similares a las del extracto crudo de *Ornithoctonus huwena* (Siemens et al., 2006). A la activación del canal TRPV1 por sustancias presentes en plantas y animales se le ha adjudicado un papel protector (Cromer and McIntyre, 2008), pues las sensaciones desagradables o dolorosas que generan estos compuestos pueden proteger a los organismos que los producen de potenciales depredadores. También la actividad antidesensibilizadora de algunos extractos de cnidarios se ha asociado con las sensaciones quemantes y el dolor mediado por TRPV1 (Cuypers et al., 2006). Sin

embargo, otros autores han aislado un péptido antagonista del canal TRPV1 a partir de la anémona *Heteractis crispata* (Andreev et al., 2008), lo que indica que los mecanismos de acción sobre un mismo blanco molecular pueden variar significativamente dentro del filo.

Entre los canales que controlan el retorno del potencial de membrana a su valor de reposo tras las fases activas de los potenciales de acción se encuentran varios tipos de canales de  $K^+$ . Tanto en modelos murinos como en humanos, los canales de  $K^+$  sensibles a voltaje, fundamentalmente los del grupo Kv2.1/2.2, así como los canales de  $K^+$  de alta conductancia activados por  $Ca^{2+}$  (BK), son los que ejercen un mayor efecto sobre la repolarización membranar (Hiriart and Aguilar-Bryan, 2008). Debido a sus efectos hiperpolarizantes, la inhibición de estos canales debería reforzar la despolarización que otros canales ejercen y por tanto incrementar la secreción de insulina. De esta manera, los canales de  $K^+$  sensibles a voltaje presentes en islotes de humanos, al ser bloqueados con Hanatoxina (HaTx), un péptido aislado de la tarántula *Grammostola spatulata* (Swartz and MacKinnon, 1995), aumentan las oscilaciones de  $Ca^{2+}$  ante una concentración de glucosa de 20 mM, de una manera similar a como se ha descrito mediante modelos dinámicos de bloqueo de estos canales (Tamarina et al., 2005).

Este tipo de toxinas resultan útiles para el estudio de los canales iónicos que participan en la secreción de insulina, pero también para determinar las propiedades

biofísicas de estas moléculas (Herrington, 2007). En apoyo a esto, ya se ha comentado la capacidad de la HaTx de modular la actividad eléctrica de las células beta. Sin embargo, la ineffectividad de otras toxinas para afectar las corrientes de  $K^+$  en las células beta han permitido descartar la participación de sus correspondientes canales blanco en la secreción de insulina. Así por ejemplo, no se han observado efectos con la margotoxina (de *Centruroides margaritatus*), kaliotoxina (de *Androctonus mauretanicus mauretanicus*) y agitoxina (de *Leiurus quinquestriatus herbraeus*), las cuales actúan como bloqueadores de canales Kv1; o con la toxina ShK (del cnidario *Styobodactyla helianthus*), un potente inhibidor de los canales Kv1.3 y Kv3.2 (Herrington et al., 2005).

Del veneno de la araña *Plesiophrictus guangxiensis* se ha aislado un péptido denominado guangxitoxina, el cual desplaza hacia la derecha la curva de activación dependiente de voltaje de los canales Kv2.1 y potencia la secreción de insulina estimulada por glucosa (Herrington et al., 2006). Interesantemente la iberiotoxina, una toxina de escorpión que bloquea los canales BK, aumenta la amplitud promedio de las espigas de potenciales de acción en células beta de humanos, pero sólo en presencia de tolbutamida (un bloqueador de los canales de  $K^+$  sensibles a ATP), por lo cual también se ha sugerido que esta toxina pudiera activar los canales  $K_{ATP}$  (Braun et al., 2008).

## **Canales de Na<sup>+</sup> activados por voltaje**

Los canales de Na<sup>+</sup> activados por voltaje se expresan comúnmente en los tejidos excitables, entre los cuales se incluyen las células neuroendocrinas. Son proteínas heteroméricas formadas por una subunidad alfa glucosilada y dos subunidades auxiliares beta (Catterall, 2000). La subunidad alfa presenta cuatro dominios (I-IV) de seis segmentos transmembranales cada uno (S1-S6), los cuales se asemejan a una subunidad de los canales de K<sup>+</sup> sensibles a voltaje. Entre sus características estructurales notables se encuentra el lazo entre los segmentos S5 y S6, el cual contribuye a determinar la permeabilidad y la selectividad del canal, el segmento S4 o sensor de voltaje, el cual se encuentra cargado positivamente y participa en el mecanismo de activación, y el lazo comunicante de los dominios III y IV, que funciona como compuerta de inactivación (Catterall et al., 2005).

Hasta el momento se han descrito nueve isoformas en la familia de los canales de Na<sup>+</sup> sensibles a voltaje (Nav1.1-1.9), las cuales comparten en común varias propiedades biofísicas y farmacológicas (Catterall et al., 2005). El canal Nav1.7 se encuentra expresado ubicuamente en líneas celulares y células nativas secretoras de insulina, aunque los miembros Nav1.3 y Nav1.6 también han sido descritos en las células beta pancreáticas de roedores y humanos respectivamente (Braun et al., 2008; Philipson et al., 1993).

Aunque se ha descrito extensamente la presencia de los canales de  $\text{Na}^+$  sensibles a voltaje en células beta pancreáticas de roedores, perros y humanos (Philipson et al., 1993), ciertamente existe una discusión histórica sobre el papel fisiológico que estos pudieran desempeñar en cada caso. En uno de los artículos clásicos que contribuyeron a resolver la controversia sobre si estos canales eran esenciales o no para la secreción de insulina, se demostró que la tetrodotoxina (TTX), un bloqueador de canales de  $\text{Na}^+$ , disminuye la secreción de insulina estimulada por glucosa de células beta aisladas de rata (Hiriart and Matteson, 1988). Se ha propuesto que estos canales contribuyen a la despolarización membranal y consecuentemente a la activación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L.

La TTX se ha utilizado frecuentemente para estudiar los canales de  $\text{Na}^+$  en líneas celulares y células beta pancreáticas de diferentes especies. La TTX (0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) disminuye la secreción de insulina en aproximadamente un 50 % en tejido humano (Braun et al., 2008), mientras que a 1  $\mu\text{M}$  reduce reversiblemente los potenciales de acción en células beta de caninos (Pressel and Mislner, 1990). La presencia de canales de  $\text{Na}^+$  activados por voltaje en ratones fue informada por primera vez por Plant (1988), quien describió que la población de estos canales se encontraba casi completamente inactivada en el potencial de membrana en reposo, por lo cual la TTX no tenía un efecto significativo en las células beta de esta especie (Plant, 1988). Sin embargo, recientemente se ha descrito una disminución significativa de la

secreción de insulina en respuesta a la glucosa en islotes intactos de ratón incubados con TTX (Ernst et al., 2009). Estos autores además observaron que ratones *knockout* para la subunidad reguladora beta-1 del canal presentan una disminución en la secreción de insulina e intolerancia a la glucosa.

Otra de las toxinas utilizadas para estudiar los canales de Na<sup>+</sup> presentes en las células beta ha sido la crotamina, un péptido proveniente de la serpiente *Crotalus durissus terrificus* que previene la inactivación de los canales (Matavel et al., 1998). Se ha descrito que una fracción activa obtenida por HPLC a partir de la crotamina, incrementa la secreción de insulina estimulada por glucosa en islotes aislados de rata con una potencia mayor a la de la crotamina nativa (Toyama et al., 2000). Las alfa-neurotoxinas de escorpiones también modulan la inactivación de los canales de sodio y se comportan como potenciadoras de la liberación de insulina. Particularmente la toxina TsTx-V (5.6 µg/ml) proveniente de la especie *Tityus serrulatus*, induce un aumento de más del doble en la secreción hormonal, lo cual se asocia con un aumento en el porcentaje de la fase activa de las oscilaciones eléctricas de las células beta, similar al efecto de la veratridina en estas (Goncalves et al., 2003).

## **Canales de $\text{Ca}^{2+}$ activados por voltaje**

Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  activados por voltaje son esenciales para el proceso de exocitosis de los gránulos de insulina, fundamentalmente los canales de tipo L. Sin embargo, existen otros canales que varían en proporción e importancia en la célula beta. En la línea celular RINm5F se ha demostrado mediante ensayos de radioligandos con  $\omega$ -conotoxina que entre el 15 y el 25% de los canales de alto umbral corresponden a los de tipo N (Aicardi et al., 1991). Esta toxina (0.3  $\mu\text{M}$ ) además disminuye en un 50% la secreción de insulina estimulada por D-gliceraldehído y aproximadamente en un tercio la estimulada por alanina o KCl, lo cual se puede deber a que estos canales desempeñan diferentes papeles fisiológicos en función del tipo de estimulación (Sher et al., 1992).

Aparentemente los canales N no contribuyen significativamente al movimiento de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células beta de humanos, pues la aplicación de  $\omega$ -conotoxina (0.1  $\mu\text{M}$ ) no afecta la secreción de insulina en condiciones basales o estimulantes de glucosa, y sólo reduce el pico de corriente de los canales de alto umbral y la entrada total de cargas en un 5% y un 3%, respectivamente (Braun et al., 2008). Sin embargo, la disección farmacológica de las corrientes en las células beta pancreáticas de humanos realizada por Braun y colaboradores (2008) reveló que aunque el canal tipo L contribuye con el 50% del pico de corriente y por consiguiente de la actividad eléctrica de estas células, la aplicación de su bloqueador isradipina (10  $\mu\text{M}$ )



sólo inhibe la secreción de insulina en un 31%. Por otra parte, los autores observaron que la  $\omega$ -agatoxina (0.2  $\mu$ M) redujo la liberación de insulina en un 80%, lo cual ilustra un papel predominante de los canales P/Q en la entrada de cargas positivas y la exocitosis en el tejido humano.

Indudablemente, la composición y las proporciones de los diferentes tipos de canales pueden variar entre los diferentes modelos de células secretoras de insulina. Un caso de esto lo constituyen las líneas celulares, las cuales al ser células desdiferenciadas pudieran cambiar el patrón de expresión de estas proteínas. Otra fuente de variabilidad pudiera ser el uso de células beta pancreáticas de diferentes especies, tal y como se ha informado en roedores y humanos.

### **Liberación de $\text{Ca}^{2+}$ desde reservorios intracelulares**

El catión  $\text{Ca}^{2+}$  desempeña un papel indispensable en la exocitosis de los gránulos de insulina. Las oscilaciones del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico se desencadenan tras el cierre de los canales  $\text{K}_{\text{ATP}}$  y se asocian al vaciamiento y llenado de los reservorios intracelulares, fundamentalmente el retículo endoplasmático (Gilon et al., 1999). El incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular puede ser reforzado por la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por los receptores a rianodina (Islam, 2002). Además, las células beta pancreáticas expresan receptores a trifosfato de inositol, cuya activación también moviliza el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Joseph et al., 1984).

La interacción entre los canales sensibles a voltajes de la membrana plasmática y los receptores localizados en los compartimientos intracelulares determina las oscilaciones lentas de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células beta (Leech et al., 1994). Esta relación se manifiesta, por ejemplo, en la activación de las corrientes catiónicas no selectivas debido a la inhibición de la recaptura de  $\text{Ca}^{2+}$  por el retículo (Cruz-Cruz et al., 2005). Además, uno de los canales presentes en la superficie celular, el TRPM2, también se localiza en los lisosomas y participa en la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta al estrés oxidativo (Lange et al., 2009). Otro organelo relevante en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular es la mitocondria (Dufer et al., 2002), la cual se ha sugerido que participa en la liberación de este catión tras el cierre de los canales  $\text{K}_{\text{ATP}}$  (Dufer et al., 2007).

La liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde estos reservorios está íntimamente relacionada con varios receptores acoplados a proteínas de unión de nucleótidos de guanina (GPCR, según sus siglas del inglés). Estos receptores intervienen en las cascadas de señalización de numerosas hormonas insulares, adrenales y entéricas, así como de los neurotransmisores del sistema nervioso autónomo. Además son el blanco molecular de varias toxinas que modulan la secreción de insulina (Holz et al., 2000).

La toxina Pertussis (TP) aislada de la bacteria *Bordetella pertussis* es una de las toxinas más estudiadas debido a que inactiva a las proteínas G inhibitorias (Gi) de los receptores alfa-2 adrenérgicos y promueve indirectamente la producción de cAMP.

El efecto de la TP ha sido estudiado para determinar el estado funcional de las proteínas Gi en los islotes pancreáticos de las ratas obesas Zucker, donde se ha observado una disminución de la respuesta respecto a las ratas control, lo cual sugiere que existen alteraciones en esta vía en el contexto de la obesidad (Cawthorn and Chan, 1991). Sin embargo, la TP también ha sido útil en la determinación de una vía insensible a esta toxina en la inhibición de la secreción de insulina por la estimulación adrenérgica (Hillaire-Buys et al., 1992).

La estimulación con catecolaminas también incluye la activación mediada por proteínas G de canales de K<sup>+</sup> rectificadores entrantes (GIRK). Estos canales se expresan en las células beta de ratón y sus corrientes hiperpolarizantes inducidas por adrenalina pueden ser reversiblemente inhibidas por la tertiapina-Q (100 nM), una toxina proveniente del veneno de la abeja *Apis mellifera* (Iwanir and Reuveny, 2008), aunque parte de esta inhibición también pudiera deberse al bloqueo de canales BK (Kanjhan et al., 2005).

La tapsigargina, un compuesto que induce el vaciamiento de los reservorios intracelulares mediante la inhibición de las ATPasas de Ca<sup>2+</sup> microsomales, aumenta en más del doble la secreción de insulina de forma independiente a la concentración extracelular de glucosa (Cruz-Cruz et al., 2005). Esto ocurre tras la activación de corrientes catiónicas no selectivas, fundamentalmente de Na<sup>+</sup>, lo cual favorece la excitabilidad y la entrada de Ca<sup>2+</sup> en las células beta. Este fenómeno es similar a las

corrientes que se generan tras la aplicación de la maitotoxina, una potente toxina producida por el dinoflagelado *Gambierdiscus toxicus* (Roe et al., 1998; Worley et al., 1994)

Entre los compuestos que incrementan el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y promueven la exocitosis de los gránulos de insulina se encuentra la alfa-latrotóxina. Este péptido aislado de la araña *Latrodectus tredecimguttatus* (conocida vulgarmente como “viuda negra”) posee dos propiedades peculiares: la capacidad de formar poros permeables a  $\text{Ca}^{2+}$ , y la presencia en su estructura de dos dominios similares a la exendina-4, una proteína análoga a GLP-1 (Holz and Habener, 1998).

### **Los cnidarios como fuente de toxinas moduladoras de canales iónicos**

Los cnidarios pertenecen a un grupo representativo de organismos productores de toxinas moduladoras de canales iónicos. En las fracciones de bajo peso molecular de los venenos de cnidarios predominan las neurotoxinas moduladoras de canales de  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$  sensibles a voltaje (Oliveira et al., 2009). Recientemente se han descrito nuevas actividades sobre canales sensibles a pH ácido (Diochot et al., 2004) y sobre los de tipo Receptor de Potencial Transitorio (TRP) (Andreev et al., 2008), además de otros péptidos cuyo blanco molecular no está definido todavía (Shiomi, 2009). Las toxinas bloqueadoras de canales de  $\text{K}^+$  se agrupan en tres familias, una de las

cuales está constituida por las Kalicludinas (Castaneda and Harvey, 2009; Honma and Shiomi, 2006).

Los péptidos que pertenecen al grupo de las Kalicludinas, combinan una actividad moduladora de canales de  $K^+$  sensibles a voltaje con un dominio funcional tipo Kunitz, denominado así por su homología estructural y funcional con los inhibidores de serino proteasas (por ejemplo, la tripsina) (Schweitz et al., 1995). La actividad moduladora de canales presente en ciertos inhibidores de proteasas de anémonas marinas les confiere una capacidad paralítica adicional a estas (Oliveira et al., 2009), además de que previene la digestión del resto de los componentes del veneno previo a la inoculación de la presa.

Entre los sitios de modulación que poseen los canales de  $Na^+$  sensibles a voltaje, cuatro corresponden a lazos extracelulares por donde se unen neurotoxinas hidrofílicas (Gordon et al., 2007; Moran et al., 2009). Con el denominado sitio 3 interactúan las toxinas de cnidarios, las alfa-neurotoxinas de escorpión y algunas de arañas, lo cual induce una disminución de la inactivación dependiente del voltaje y por tanto una sobreactividad del canal (Catterall and Beress, 1978; Gordon and Zlotkin, 1993; Little et al., 1998). Por otra parte, las beta-neurotoxinas de escorpión y otras de arácnidos actúan en el sitio 4 y promueven la activación del canal a potenciales de membrana más bajos que su umbral fisiológico y, por tanto, aumenta la actividad del canal (Cestele and Catterall, 2000).

Se ha demostrado que la ganancia de actividad de estos canales, inducida por toxinas modificadoras de los mecanismos de compuerta, prolonga los potenciales de acción nerviosos. La consecuencia fisiológica de esto es una transmisión neuromuscular incrementada que puede causar parálisis contráctil y muerte del organismo intoxicado (Moran et al., 2009).

### **Breve reseña de las especies de interés**

#### ***Zoanthus sociatus* (Ellis, 1767)**

La especie *Zoanthus sociatus* (Cnidaria, Anthozoa, Zoantharia, Zoanthidea, Zoanthidae) está distribuida en todo el Atlántico tropical. En el Caribe los especímenes forman colonias sésiles a 1- 1.5 metros de profundidad (Varela et al., 2002), las cuales consisten de zooides con longitudes mayores de 1 cm y con diámetros de aproximadamente 0.5 cm. Esta especie presenta relaciones simbióticas con zooxantelas, lo cual constituye una importante fuente fijación de carbono para su nutrición (Steen and Muscatine, 1984). Además, sus colonias exhiben una elevada tasa de regeneración (Karlson, 1983), por lo cual se pudieron coleccionar varios especímenes sin consecuencias negativas en la población natural, los cuales formaron nuevas colonias en los estanques del acuario.

Para los zoantídeos no existen informes de péptidos bioactivos, sin embargo sí se ha descrito la presencia de una toxina hemolítica muy potente, la palytoxina, la cual

ha sido detectada en la especie de interés por Gleibs et al. (1995) (Gleibs et al., 1995). Además, en *P. axinellae*, otro miembro de esta familia, se encontró un inhibidor de la acetilcolinesterasa, del tipo de la pseudozoanthoxantina (Turk et al., 1995). En *Z. sociatus* también se han descrito alcaloides que afectan la agregación plaquetaria (Villar et al., 2003) e incluso actividades antifiláricas en extractos con mezclas de metanol-cloroformo (Lakshmi et al., 2004).

### ***Physalia physalis* (Linnaeus, 1758)**

*Physalia physalis* pertenece a los sifonóforos, un grupo de organismos coloniales altamente estructurados (Dunn, 2009). Estos animales viven en un hábitat pelágico y se encuentran distribuidos por todo el Océano Atlántico. Sus tentáculos venenosos presentan una serie de células llamadas nematocitos, las cuales poseen nematocistos, unos organelos especializados en el almacenamiento e inoculación de toxinas. Estos últimos presentan un diámetro promedio entre 10.6 y 23.5  $\mu\text{m}$ , con una mayor toxicidad asociada a las estructuras más pequeñas (Burnett et al., 1986).

El contacto accidental con *P. physalis* puede causar diversos síntomas como el dolor intenso, náuseas, vómito, placas urticantes y necrosis de la piel, pero también estrés cardiorrespiratorio e incluso la muerte en caso de intoxicación severa (Haddad et al., 2002). Entre los efectos biológicos del veneno de esta especie se encuentran la liberación de histamina por los mastocitos (Cormier, 1984), la

dilatación de la musculatura vascular (Loredo et al., 1985, 1986), y la permeabilidad de los capilares cutáneos (Burnett and Calton, 1986). Además, los casos de envenenamiento con *P. physalis* pueden desarrollar inmunoglobulinas específicas (Ig), las cuales muestran reactividad cruzada con toxinas de otras especies como *Chrysaora quinquecirrha* (Russo et al., 1983).

Se ha demostrado que el veneno de *P. physalis* afecta los flujos transmembranales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  (Larsen and Lane, 1970), así como los de  $\text{Ca}^{2+}$ , un efecto que no es posible evitar con bloqueadores específicos de canales (Edwards et al., 2000). También se ha descrito una toxina de 85 kDa que bloquea reversiblemente la transmisión sináptica glutamatérgica de neuronas del molusco *Zachrysia guanesis* y la unión neuromuscular del crustáceo *Cambarus clarkii* (Mas et al., 1989). Otro modulador de canales iónicos es la proteína de 200 kDa  $\text{P}_1$ , la cual actúa como antagonista de los receptores nicotínicos de las neuronas de moluscos y la unión neuromuscular de rana (Menendez et al., 1990). Sin embargo, se conoce poco acerca de las actividades de los compuestos de bajo peso molecular del veneno de esta especie.



## PRIMERA PARTE: EFECTOS DE LAS TOXINAS DE CNIDARIOS MARINOS SOBRE LA SECRECIÓN DE INSULINA

### Planteamiento del problema

El filo Cnidaria constituye una fuente aún no agotada para el descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos. Una de las características más prominentes de este grupo es la presencia de cnidocistos, organelos especializados en la síntesis de sustancias tóxicas que confieren mecanismos de depredación y defensa. La biodiversidad de celenterados y sus venenos en los arrecifes caribeños resulta de gran interés pues un gran número de especies se encuentran inexploradas. Además, los estudios sobre efectos *in vivo* de las toxinas de cnidarios son escasos cuando se comparan con las investigaciones a niveles celular y molecular (Suput, 2009).

Al respecto, la mayor parte de las acciones biológicas se refieren a la hemólisis (Alvarez et al., 2009), la neurotoxicidad (Sanchez-Rodriguez and Cruz-Vazquez, 2006) y la cardiotoxicidad (Noguchi et al., 2005). Sin embargo, hasta el momento ninguna acción sobre la secreción de insulina había sido reportada, al menos hasta donde alcanza nuestro conocimiento, a pesar de la abrumadora cantidad de evidencias sobre toxinas de otros organismos venenosos que modulan la excitabilidad de las células beta pancreáticas (Diaz-Garcia et al., 2010). En el presente trabajo nos propusimos estudiar los efectos de los extractos crudos de los

cnidarios marinos *Zoanthus sociatus* y *Physalia physalis*, así como de sus fracciones de bajo peso molecular, sobre la secreción de insulina estimulada por glucosa.

## **Hipótesis**

Las neurotoxinas de bajo peso molecular procedentes de cnidarios marinos modulan la excitabilidad de las células beta pancreáticas y consecuentemente afectan la liberación de insulina.

## **Objetivo General**

Estudiar y caracterizar las actividades biológicas de los venenos de cnidarios marinos sobre la secreción de insulina.

## **Objetivos Específicos**

1. Detectar la posible actividad moduladora sobre la secreción de insulina de los extractos crudos de los venenos de *Zoanthus sociatus* y *Physalia physalis*.
2. Purificar los compuestos de bajo peso molecular y evaluar su actividad sobre la secreción de insulina mediante el ensayo hemolítico inverso.
3. Caracterizar bioquímicamente las sustancias bioactivas responsables de los efectos.

4. Caracterizar el efecto de estas toxinas sobre las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en las células beta.

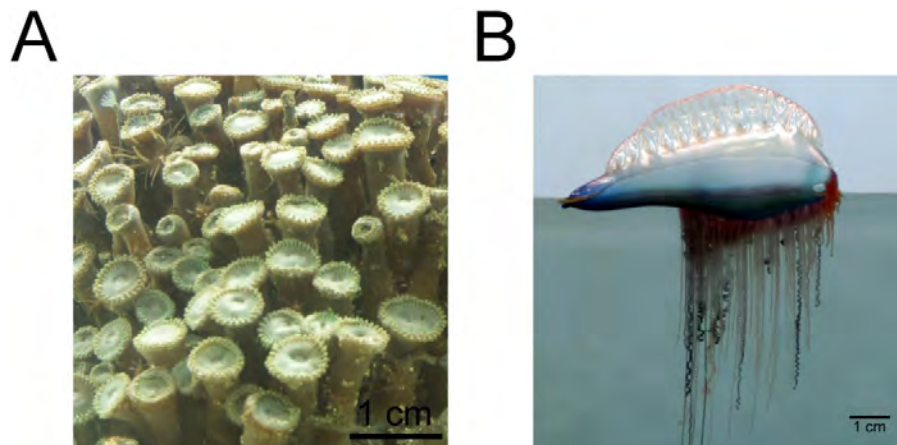
## MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES PARA TODOS LOS PROBLEMAS DE ESTUDIO

### Reactivos

Los reactivos se obtuvieron de las siguientes fuentes: la colagenasa P de Roche (Mannheim, Germany), la  $\omega$ -conotoxina GVIA de Alomone (Jerusalem, Israel); la albúmina de suero bovino (BSA según sus siglas del inglés *bovine serum albumin*), el HEPES, la poli-L-lisina, la tripsina, el estándar de insulina, el propranolol, el Ficoll y todas las sales se obtuvieron de Sigma (St.Louis, MO, USA); las anfolinas pH 3-9 de GE Healthcare (New Jersey, USA), el material plástico para cultivos celulares de Corning (Corning, NY, USA); el suero bovino fetal (SBF) de Equitech-BIO (Ingram, TX, USA); la solución salina balanceada de Hanks y el medio RPMI 1640, así como la solución antibiótica antimicótica de penicilina, estreptomina y anfotericina B de Life Technologies (Carlsbad, CA., USA). El ácido trifluoroacético (TFA) y el acetato de amonio se obtuvieron de Sigma, mientras que el acetonitrilo (ACN) se obtuvo de Burdick & Jackson (Honeywell Inc., New Jersey, USA). La insulina (Humulin<sup>®</sup>) fue obtenida de Eli Lilly y Compañía de México S.A de C.V (México), el NGF 2.5S de Millipore (Temecula CA, USA), y la heparina (Inhepar<sup>®</sup>) de PiSA<sup>®</sup> Farmacéutica (México).

## Colecta del material biológico

Los especímenes de *Zoanthus sociatus* y *Physalia physalis* fueron colectados en el litoral de La Habana, Cuba y se llevaron inmediatamente al laboratorio inmersos en agua de mar para la preparación de los extractos crudos (**Figura 1**).



**Figura 1. Especies de interés.** (A) Colonia de *Z. sociatus* constituida por varios zooides de aproximadamente 1 cm de altura. (B) Colonia de *P. physalis* cuyos tentáculos contienen los nematocistos productores de toxinas.

## Preparación del extracto crudo

Los extractos crudos se prepararon de acuerdo a un protocolo modificado a partir de un método previamente descrito (Gómez et al., 1986). Brevemente, tras retirar el disco pedal, el cuerpo total de *Z. sociatus* o los tentáculos de *P. physalis* se tomaron y se cortaron en pequeños pedazos. El material biológico resultante se mezcló con agua a 4 ° C (1:1 v/v) y se sometió de 5 a 10 períodos de autólisis y agitación

mecánica en batidora durante 5 segundos, cada uno a temperatura ambiente. El lisado final se clarificó mediante un tamiz de lana de vidrio y luego se centrifugó dos veces a 1145 g, a 4 °C durante 30 min. El sobrenadante se recuperó, se liofilizó y se conservó a - 20 °C hasta su uso.

### **Electroforesis SDS-PAGE**

La electroforesis desnaturizante SDS-PAGE se realizó bajo condiciones reductoras (Schagger and von Jagow, 1987). Se utilizó un gel separador discontinuo que contuvo una porción de 1 cm de longitud al 10 % de acrilamida, mientras que el resto del gel fue del 16 %. Las proteínas y los péptidos del extracto crudo se tiñeron con Coomassie R-250 Brilliant Blue para la estimación de sus pesos moleculares relativos.

### **Procedimientos de purificación**

El extracto crudo liofilizado se resuspendió en una solución de 0.1 M de acetato de amonio a pH 6.7, hasta una concentración final de 2.5 mg/ml, y luego se pasó por un filtro de tamaño de poro 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore, Billerica, USA). Se prepararon alícuotas de 2 ml de esta muestra, se inyectaron en una columna de filtración en gel HiLoad 16/20 Superdex 75 y se registraron sus diagramas de elución a una longitud de onda de 280 nm. La columna fue previamente equilibrada en la misma solución

de resuspensión de la muestra (0.1 M de acetato de amonio, pH 6.7) en un sistema Akta FPLC (GE Healthcare, USA), a un flujo de 1 ml/min. Las fracciones de bajo peso molecular que exhibieron una actividad potenciadora de la secreción de insulina fueron colectadas y cargadas en una columna Phenomenex ODS-3 de fase reversa y equilibrada en una solución acuosa al 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA). Los componentes eluyeron mediante la aplicación de un gradiente lineal del 0% al 100% de acetonitrilo (ACN) al 0.12 % de TFA, a un flujo de 1 ml/min. Los espectros de absorbancia de los picos activos se obtuvieron en la gama UV-Visible de 200 a 800 nm mediante un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800. La concentración de proteína se determinó mediante un ensayo comercial basado en el método del ácido bicinonínico (Thermo Scientific, Rockford, IL. USA). Las muestras se leyeron a 562 nm mediante un lector de microplacas Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader (Biotek Instruments, Inc., Vermont, USA).

### **Tabla de purificación**

La actividad potenciadora de la secreción de insulina de cada paso de purificación fue calculada como la fracción de incremento en el área de inmunoplaca a 5.6 mM (ver sección sobre el ensayo hemolítico inverso), dividida por el volumen de ensayo y multiplicado por la dilución de la toxinas. La actividad potenciadora total se calculó como la actividad potenciadora multiplicada por el volumen total en cada

paso de purificación, y la actividad específica fue determinada dividiendo la anterior por la masa total de toxina en cada paso. Finalmente, el rendimiento y el grado de pureza se obtuvieron mediante la división de la actividad potenciadora total o la actividad específica de cada paso de purificación sobre el valor del extracto crudo, respectivamente.

### **Espectrometría de masas**

Para la fracción de bajo peso molecular de *Z. sociatus* se utilizó un espectrómetro de masa Esquire 6000 (Bruker, Bremen, Germany), equipado con una fuente de ionización por electrospray (ESI) y un detector de trampa de iones. Los iones se formaron a partir de una solución acuosa de la muestra a una concentración de 2 mg/ml y al 1% de ácido fórmico. Aproximadamente 50  $\mu$ l de la muestra se introdujeron a la fuente ESI a un flujo de 5  $\mu$ l/min con el empleo de una jeringa acoplada a una bomba. La temperatura capilar y el voltaje del atomizador se mantuvieron a 200 °C y 278.5 V, respectivamente. El intervalo de barrido fue de 200 a 6000 Da, durante un tiempo total de 4.4 min, y alternancia de períodos de barrido de 3 s separados por 0.1 s entre sí. Las señales de los iones se observaron en el modo positivo de ionización con valores de razón masa/carga ( $m/z$ ) entre 2000 y 6000 Da. La adquisición de datos y los espectros de masas fueron procesados con el programa Compass (Bruker, Bremen, Alemania).



Para las toxinas aisladas del extracto crudo de tentáculos de *Physalia physalis* se utilizó un espectrofotómetro Omnix basado en ionización por desorción asistida por matriz y determinación del tiempo de vuelo (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania), equipado con un láser de nitrógeno ( $\lambda = 337$  nm, 10 ns de pulso). Los espectros fueron adquiridos en el modo de reflexión positiva con un voltaje de aceleración de 19 kV. Las toxinas se disolvieron en una solución saturada de ácido alfa-ciano-4-hydroxicinámico en acetonitrilo al 30% y 0.1% de TFA, con trifluoroacetato de sodio como catalizador de la ionización. Se utilizaron como calibradores externos la ribonucleasa (14000 Da) y la angiotensina I (1046.2 Da).

### **Secuenciación del extremo N-terminal**

Las secuencias de las toxinas de interés se trataron de determinar mediante la degradación de Edman, con el empleo de un secuenciador de proteínas de fase gaseosa (Model LF 3000, Beckman Instruments, Irvine, USA).

### **Animales de experimentación**

El cuidado de los animales se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo publicado en la "*International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals*", *Council for International Organizations of Medical Sciences*, 2010). Las ratas Wistar adultas macho se obtuvieron de acuerdo a las facilidades locales y se sometieron a un fotoperíodo luz

: oscuridad de 12 : 12 horas (06:00 – 18:00), el cual ha sido estandarizado por el personal del bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM con el objetivo de sincronizar las oscilaciones hormonales, y por tanto hacer más homogéneos los ciclos reproductivos y el estado metabólico de las ratas. A los animales se les permitió el acceso libre a una dieta estándar de laboratorio y agua de beber. El día de los experimentos, los animales se anestesiaron intraperitonealmente con pentobarbital sódico (40 mg/kg), y tras la disección del páncreas, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Los cultivos primarios de células beta pancreáticas, así como los ensayos con animales íntegros, se realizaron siempre en el horario de 10:00 a 11:00 a.m.

Los ratones de fenotipo silvestre (WT según sus siglas en inglés *wild type*) de la cepa C57BL/6J y los ratones carentes del canal TRPV1 (*Trpv1*<sup>-/-</sup>), se obtuvieron de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine) y se genotipificaron posteriormente mediante un protocolo descrito anteriormente (Nieto-Posadas et al., 2012). Las condiciones de mantenimiento y experimentación de estos animales fueron similares a las descritas anteriormente para las ratas.

### **Índices morfométricos**

El peso de los animales se midió con el empleo de una balanza analítica (Compax CX-6000). Las tallas se midieron desde la nariz hasta la base de la cola en la

posición supina, con el empleo de una cinta métrica (Seretide<sup>®</sup> Diskus<sup>®</sup>), así como la circunferencia abdominal. A partir de las mediciones de la talla y el peso del animal se calculó el índice de masa corporal.

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

Las células beta pancreáticas se obtuvieron según el protocolo utilizado en el laboratorio de la Dra. Marcia Hiriart (Aguayo-Mazzucato et al., 2006). Brevemente, los islotes pancreáticos fueron aislados y separados del tejido acinar mediante digestión con colagenasa y una centrifugación en gradiente de Ficoll. La disociación de las células insulares se realizó tras resuspender los islotes en solución de Spinner libre de calcio, con 15.6 mM de glucosa, 0.5% albúmina y 0.01% tripsina e incubarlos en un baño en agitación a 37°C durante 10 min. Las células dispersas fueron cultivadas durante 1 a 3 días en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal, 200 unidades/ml de penicilina G, 200 mg/ml de estreptomicina, y 0.5 mg/ml anfotericina B.

La línea de insulinoma de rata RINm5F (ATCC) se cultivó en medio RPMI-1640 suplementado como se describió anteriormente para los cultivos primarios de rata. En los experimentos con NGF, el suero bovino fetal se disminuyó al 1%. Las células se mantuvieron en crecimiento a una temperatura de 37 °C y en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> y 95% de humedad del aire.

## **Ensayo Hemolítico Inverso (RHPA según sus siglas del inglés *Reverse Hemolytic Plaque Assay*)**

Para identificar las células secretoras de insulina, se realizó un RHPA con un método similar al descrito por Hiriart y Matesson (1988) (Hiriart and Matteson, 1988). Después de un día de cultivo las células fueron despegadas y resuspendidas a una densidad de  $10^6$  células/ml, tras lo cual se mezclaron en partes iguales con eritrocitos de borrego cubiertos con proteína A de *Staphylococcus aureus*. Esta mezcla se introdujo en cámaras de Cunningham previamente tratadas con poli-L-lisina y se mantuvo en incubación durante una hora.

Las células fueron estimuladas con varias concentraciones de glucosa, o con alto potasio, en presencia o ausencia de las toxinas de interés. Simultáneamente se incubaron con un antisuero contra insulina y posteriormente se les aplicó sistema de complemento de cobayo. La liberación de insulina se detectó mediante la presencia de placas alrededor de las células secretoras, como resultado de la lisis mediada por complemento de los eritrocitos que tuvieron complejos de insulina y su anticuerpo en sus membranas.

Cada cámara de Cunningham fue escaneada a una magnificación de 100 o 400X con un microscopio Leika Micro Dissection System 6000 (version 6.4.1.2887) acoplado a una cámara Hitachi HV-D20. Las áreas de inmunoplaaca y el porcentaje de células secretoras fueron medidos en cada una, donde se contaron al menos 50

células por réplica. Para cada condición se realizaron al menos tres experimentos independientes por duplicado.

El efecto de las fracciones activas sobre la función secretora en general se describe como el índice de secreción, calculado como la multiplicación del área de inmunoplaca (AIP) promedio y la fracción de células secretoras. También se construyeron histogramas de frecuencia de las áreas de inmunoplaca y se analizaron los efectos de las toxinas en las subpoblaciones de células secretoras (Hiriart and Ramirez-Medeles, 1991), donde se consideraron dos grupos principales: los que forman placas pequeñas (SP según sus siglas en inglés *small plaque-forming cells*, con  $AIP \leq 2000 \mu\text{m}^2$ ) y las de placas grandes (LP según sus siglas en inglés *large plaque-forming cells* con  $AIP > 2000 \mu\text{m}^2$ ).

### **Viabilidad celular**

La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de exclusión con azul tripano. Se sembraron aproximadamente 25 mil células en placas de 96 pocillos que luego fueron incubadas durante 8 horas con medio RPMI 1640 suplementado con glutamina y antibióticos. Después el medio fue reemplazado con 50  $\mu\text{l}$  de las soluciones equivalentes a las utilizadas en el RHPA y se incubaron durante el tiempo que duró este ensayo. Finalmente se adicionó una solución de azul tripano al 0.4% y 3 min después se contaron las células teñidas de azul (muertas) y aquellas

que no tuvieran color (vivas). Al menos 100 células de tres campos aleatorios en cada pocillo fueron contadas. La viabilidad se expresó como el porcentaje de células sin tinción sobre el total de las células analizadas.

### **Mediciones de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular**

Las células se sembraron en cubreobjetos cubiertos previamente con poli-L-lisina (0.5 mg/ml). Después de 24-48 horas de cultivo, las células se cargaron con el indicador Fluo-4AM (1  $\mu\text{M}$ ) (Molecular Probes) disuelto en solución salina balanceada de Hanks suplementada con 0.1% BSA y antibióticos (penicilina-estreptomicina al 1%), durante 30-40 min. Luego se lavaron con el mismo medio (3 volúmenes) y se dejaron equilibrar en este durante 20 min.

Para los estudios con *Z. sociatus*, las células beta se observaron a través de un objetivo de inmersión en aceite 100X (ApoTIRF Nikon) y la epifluorescencia se midió con el empleo de un microscopio Nikon Eclipse TE200 a una longitud de excitación de 488 nm y una emisión de 535 nm, con un tiempo de exposición de 20 ms. Las imágenes se adquirieron cada 1 segundo durante 10 min a una temperatura del cuarto de 23 °C y se utilizó el programa TILL Photonics Imaging System. Los cambios en la fluorescencia se midieron como la intensidad media de los pixeles contenidos en las áreas de interés trazadas sobre las células, y se expresaron como la variación relativa respecto a la fluorescencia inicial ( $\Delta F/F_0$ ). La pérdida por

fotopagamiento fue corregida en cada registro restando la caída exponencial de las señales de fluorescencia.

Para los estudios con *P. physalis*, las células beta se observaron a través de un objetivo de inmersión en aceite 60X y la fluorescencia se midió con el empleo de un microscopio confocal BioRad MRC 1024. Las imágenes se adquirieron cada 3.5 segundos durante 10 min a una temperatura del cuarto de 17 °C y se utilizó el programa Confocal Assistant versión 4.02. Finalmente, para los estudios del canal TRPV1 en las células beta, se utilizó un microscopio de emisión de epifluorescencia Olympus IX-71, con el cual se colectó un ancho de banda de emisión de 450-650 nm. Se utilizó un objetivo de inmersión en aceite de 40X y se adquirieron las imágenes cada 1 segundo a temperatura ambiente 21-23 °C, con el empleo de una cámara digital evolution TM VF Cooled Color 12-bits.

## **Electrofisiología**

Los registros de corriente en microáreas de membrana en la modalidad de célula entera (*whole-cell patch-clamp*) (Hamill et al., 1981) se realizaron a 21 °C con el empleo de un amplificador Axopatch 200B (Axon Instruments, Foster City, CA) acoplado a una tarjeta DigiData 3200 (Axon Instruments, Foster City, CA). Un cable de Ag-AgCl se empleó como electrodo de referencia. Los electrodos se fabricaron a partir de tubos capilares Kimax-51 (Kimble Glass, Vineland, NJ) y se pulieron hasta una

resistencia de pipeta de 2-4 M $\Omega$ . Las puntas de los electrodos se cubrieron con Sylgard (Dow Corning, Midland, MI) o cera dental para reducir la capacitancia inherente a las pipetas. Tras acceder a la configuración de célula entera, la resistencia en serie se compensó en aproximadamente un 50-70%, a fin de obtener una resistencia en serie no compensada menor al doble de la resistencia de pipeta, para la cual el error de imposición de voltaje fuera  $< 2\%$ . Sólo se analizaron los registros de células con gigasellos estables, cuyas capacitancias fueron de  $6.4 \pm 0.4$  pF (N=16) y  $5.9 \pm 0.4$  pF (N=12) para células beta de ratas adultas y neonatas respectivamente. Las señales se filtraron a 2 kHz previamente a la digitalización de los registros. La generación de pulsos y la adquisición de datos se realizaron con el programa PClamp versión 8 (Axon Instruments). Las corrientes CAN se obtuvieron mediante protocolos de pulsos de 250 ms de duración, y variaciones de voltaje de 10 mV, a partir de un potencial de mantenimiento de -80 mV. Las relaciones corriente a voltaje se determinaron a partir del promedio de los últimos 50 ms de los trazos de corriente obtenidos por el protocolo de pulsos, los cuales se graficaron en función del potencial de membrana impuesto.



## **Soluciones de registro**

La solución extracelular contuvo (mM): 140 NaCl, 10 HEPES, 5 MgCl<sub>2</sub>, 10 Glucosa y 100 nM TTX; pH = 7.4 y 285-295 mOsm/kg. La solución intracelular contuvo (mM): 140 NaCl, 10 HEPES y 2 EDTA; pH = 7.2 y 275-280 mOsm/kg.. En los registros de células RINm5F, se modificó la solución interna a fin de mejorar los sellos y reducir las corrientes de fuga, de la siguiente manera: 100 CsAsp, 10 CsCl, 5 CsF, 20 NaCl, 10 HEPES, 2.5 BAPTA; pH = 7.2 y 283 mOsm/kg.

## **Medición de la Insulina Plasmática**

Los animales se mantuvieron en ayunas durante 12 horas y luego se anestesiaron, se tomó la sangre de la vena cava con una jeringa estéril y se colocó en tubos heparinizados. Luego la sangre fue centrifugada a 8870 g y 4-6 °C durante 19 min, en una centrífuga Eppendorf 5415R. Los sobrenadantes se recuperaron y se almacenaron a -70 °C antes de usarlos. Los niveles de insulina en plasma se midieron con un kit comercial Ultrasensitive Rat Insulin ELISA (Merckodia, Uppsala, Sweden; Cat. 10-1173), de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

### **Prueba de tolerancia intraperitoneal a la glucosa**

Una dosis alta de glucosa (2 g/kg) se inyectó intraperitonealmente en ratas tratadas con solución salina (controles) o las toxinas activas, o en ambos grupos de ratones para el caso del estudio del canal TRPV1. Se tomaron muestras de sangre en la cola de estos animales a tiempo 0 (antes de la inyección de glucosa) y a los 15, 30, 60, 90 y 120 min (en ocasiones se realizó una toma a los 180 min también, según se especifica luego en el texto) después de la inyección, con un glucómetro comercial (Accu-Chek Active, Roche).

### **Prueba de tolerancia intraperitoneal a la insulina**

Los ratones WT o *Trpv1<sup>-/-</sup>* se inyectaron con una dosis de insulina (0.2 U/kg). Se tomaron muestras de sangre en la cola de estos animales a tiempo 0 (antes de la inyección de glucosa) y a los 15, 30, 60, 90, 120 y 180 min después de la inyección, con un glucómetro comercial (Accu-Chek Active, Roche).

### **Análisis de datos**

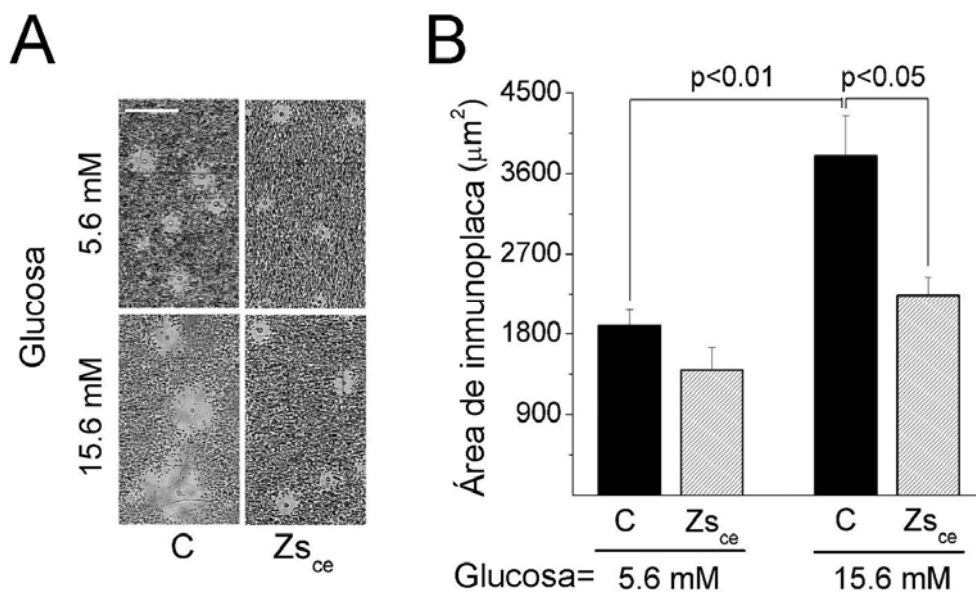
El procesamiento de imágenes posterior a la adquisición de estas se realizó con el programa ImageJ del NIH, USA (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). La normalidad de los datos de cada grupo experimental se analizó mediante una prueba Kolmogorov-

Smirnov. En caso de incumplimiento de la normalidad, los datos se transformaron a sus raíces cuadradas (Latham, 1978; Osborne, 2010) y se ensayaron nuevamente. Al cumplirse la normalidad, se aplicó una prueba *t-student*, junto a una corrección de Welch en caso de heterogeneidad de varianzas. Si los datos no se ajustaban a una distribución Gaussiana, se seleccionó una prueba no paramétrica de Mann-Whitney. El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad InStat versión 3.00 (GraphPad Software, San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Para construir los gráficos se utilizó el programa Origin version 7 (OriginLab Corporation, Northampton USA, [www.OriginLab.com](http://www.OriginLab.com)).

## RESULTADOS

### Efecto del extracto crudo de *Z. sociatus* sobre la secreción de insulina

Las células beta fueron incubadas durante una hora en ausencia o presencia del extracto crudo de *Z. sociatus* ( $Z_{s_{ec}}$  50  $\mu\text{g/ml}$ ) durante los ensayos de secreción de insulina por RHPA. Como era de esperar, en condiciones control la glucosa a una concentración de 15.6 mM causó un incremento de casi el doble en las áreas de inmunoplaca respecto a la condición de baja glucosa (5.6 mM). Sin embargo, la secreción de insulina estimulada por alta glucosa fue de sólo 1.6 veces respecto a la basal en las células tratadas con  $Z_{s_{ec}}$ , lo que significa una reducción en la respuesta de estas células en aproximadamente un 40% con respecto a las células controles (Figura 2).



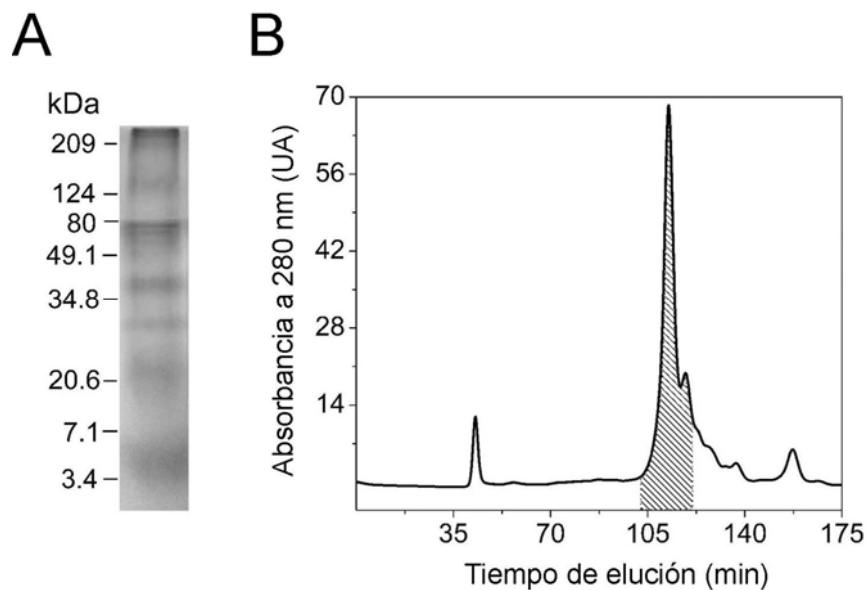
**Figura 2. Efectos del extracto crudo de *Zoanthus sociatus* sobre la secreción de insulina en células beta pancreáticas aisladas. (A)** Micrografías de las áreas de inmunoplaaca (AIP) medidas mediante un ensayo hemolítico inverso (RHPA). Barra de escala 200 µm. **(B)** Comparación de las AIP entre las condiciones experimentales en que fueron analizadas las células control (C) y las tratadas con el extracto crudo de *Z. sociatus* (Zs<sub>ce</sub>, 50 µg/ml). Las AIP se representan con barras, cuyos valores corresponden al promedio ± el error estándar de la media (SEM, según sus siglas del inglés) de 3 experimentos independientes por duplicado, donde se contaron al menos 50 células por cada cámara. Las AIP son las regiones oscuras alrededor de las células beta, las cuales se formaron tras una hora de incubación de las células insulares en 5.6 o 15.6 mM de glucosa, en presencia de un anticuerpo contra insulina y sistema de complemento. Estas AIP son directamente proporcionales a la cantidad de insulina secretada por las células beta individuales.

## **Obtención de la fracción de bajo peso molecular a partir del extracto crudo de *Z. sociatus***

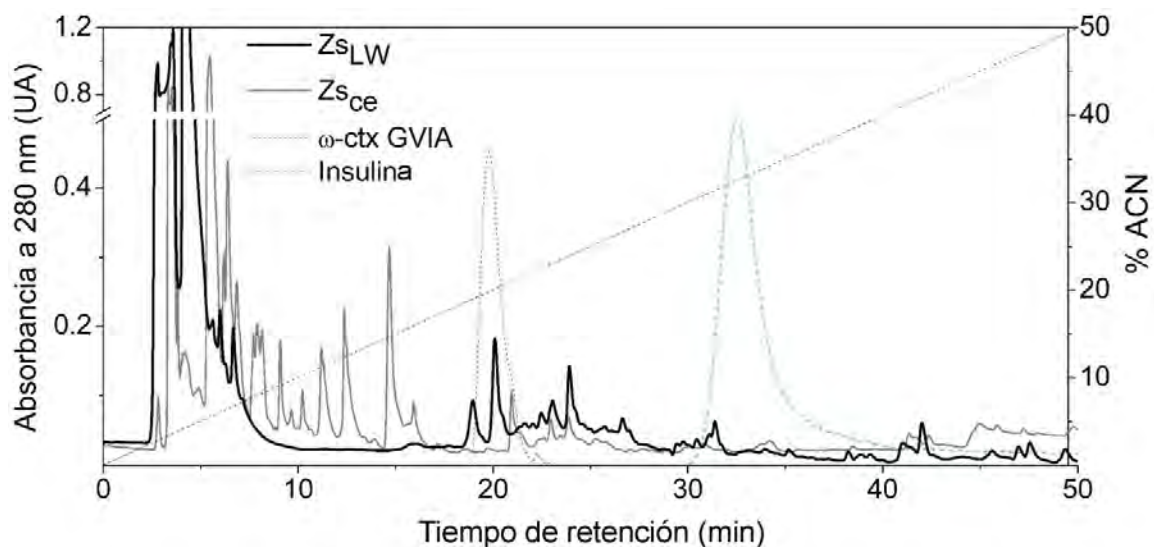
El análisis electroforético en geles desnaturizantes (SDS-PAGE) del extracto crudo de *Z. sociatus* mostró varias bandas cuyos pesos moleculares variaron desde centenares de kDa hasta menos de 10 kDa (**Figura 3A**). Dicho extracto crudo se fraccionó mediante una filtración en gel en columna Superdex75. A partir de esta cromatografía se colectaron y mezclaron las fracciones del pico más prominente del cromatograma (**Figura 3B**), las cuales correspondieron a compuestos de bajo peso molecular, de acuerdo a sus tiempos de retención en la columna. Esta fracción, denominada  $Z_{s_{LW}}$ , mostró los mismos efectos inhibitorios sobre la secreción de insulina estimulada por glucosa en el RHPA.

Al analizar esta fracción de bajo peso molecular por espectrometría de masas, se identificaron al menos cuatro compuestos cuyas masas fueron de 6397.7, 4179.1, 4874.7 y 2131.2 Da. Esta fracción también se sometió a un análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en columna C-18, donde se analizó la proporción de los picos respecto al extracto crudo, así como la comparación de sus tiempos de elución con dos estándares de moléculas pequeñas y compactas (la  $\omega$ -conotoxina GVIA y la insulina). El perfil cromatográfico de la fracción  $Z_{s_{LW}}$  (15  $\mu$ g) presentó una región enriquecida de picos respecto al extracto crudo (130  $\mu$ g),

cuyos tiempos de retención quedaron comprendidos fundamentalmente entre los obtenidos para la  $\omega$ -conotoxina GVIA (100  $\mu$ g) y la insulina (30  $\mu$ g) (**Figura 4**).



**Figura 3. Electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE y filtración en gel del extracto crudo de *Z. sociatus*.** (A) La electroforesis desnaturalizante de *Z. sociatus* mostró una mezcla de proteínas con pesos de más de 200 kDa hasta menos de 10 kDa. Para mejorar la resolución de las bandas debido a su heterogeneidad de pesos moleculares, se utilizó un gel separador discontinuo de 10 a 16% de acrilamida. (B) El perfil cromatográfico obtenido en el proceso de filtración en gel, a una longitud de onda de 280 nm, se caracterizó por un pico mayoritario cuyos pesos moleculares fueron inferiores a los 7 kDa de acuerdo a los resultados de la espectrometría de masas. La región sombreada corresponde a la fracción de bajo peso molecular donde se detectó la actividad inhibitoria sobre la secreción de insulina, similar al extracto crudo.



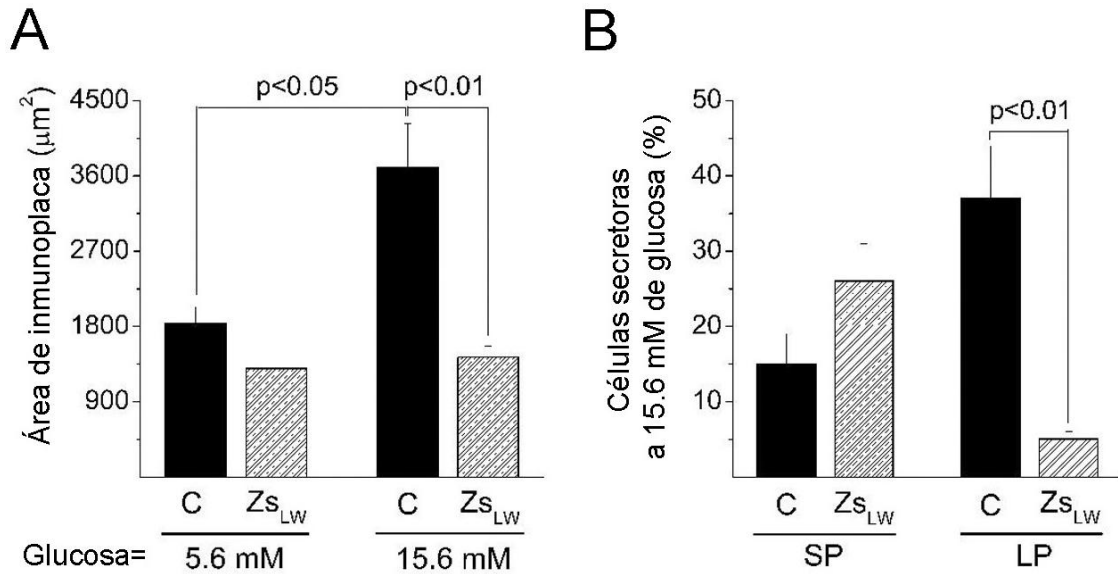
**Figura 4. Cromatografía analítica del extracto crudo de *Z. sociatus* y su fracción de bajo peso molecular mediante HPLC de fase reversa con columna C18.** Los cromatogramas a 280 nm muestran una región enriquecida de picos en la fracción de bajo peso molecular ( $Z_{s_{LW}}$ ) respecto al extracto crudo de *Z. sociatus* ( $Z_{s_{ce}}$ ) cuyos tiempos de retención, en su mayoría, quedaron comprendidos entre los de la  $\omega$ -conotoxina GVIA ( $\omega$ -ctx GVIA) y la insulina.

#### **Efecto de la fracción de bajo peso molecular de *Z. sociatus* sobre la secreción de insulina**

La fracción  $Z_{s_{LW}}$  (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) fue probada en las mismas condiciones que el extracto crudo en los RHPAs y redujo el área de inmunoplaaca promedio en más del 60%. A pesar de que hubo una tendencia a disminuir los niveles de secreción basal de insulina, su efecto sólo fue significativo en condiciones de glucosa alta. Además, esta fracción de bajo peso molecular redujo el porcentaje de células secretoras,



afectando fundamentalmente la subpoblación de células con placas grandes (LP) (Figura 5).



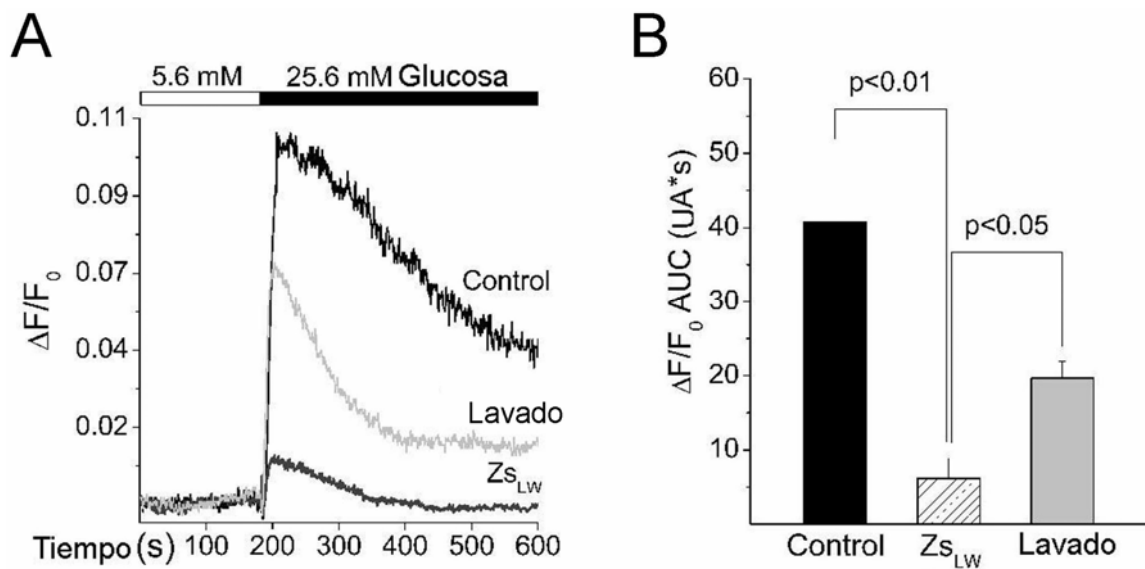
**Figura 5. Efectos de la fracción de bajo peso molecular de *Z. sociatus* sobre la secreción de insulina en células beta pancreáticas. (A)** Se muestran las AIP medidas mediante el RHPA en condiciones control (C) y con el tratamiento con la fracción de bajo peso molecular de *Z. sociatus* (Zs<sub>LW</sub>, 50 µg/ml). **(B)** Análisis de subpoblaciones de células secretoras, donde se muestran los porcentajes de células SP y LP de ambas condiciones experimentales, estimuladas con una concentración de glucosa de 15.6 mM. Los valores de las barras representan el promedio ± SEM de 3 experimentos diferentes por duplicado, donde se contaron al menos 50 células por cámara.

### **La fracción de bajo peso molecular de *Z. sociatus* inhibe el incremento del $\text{Ca}^{2+}$ intracelular en respuesta a la glucosa**

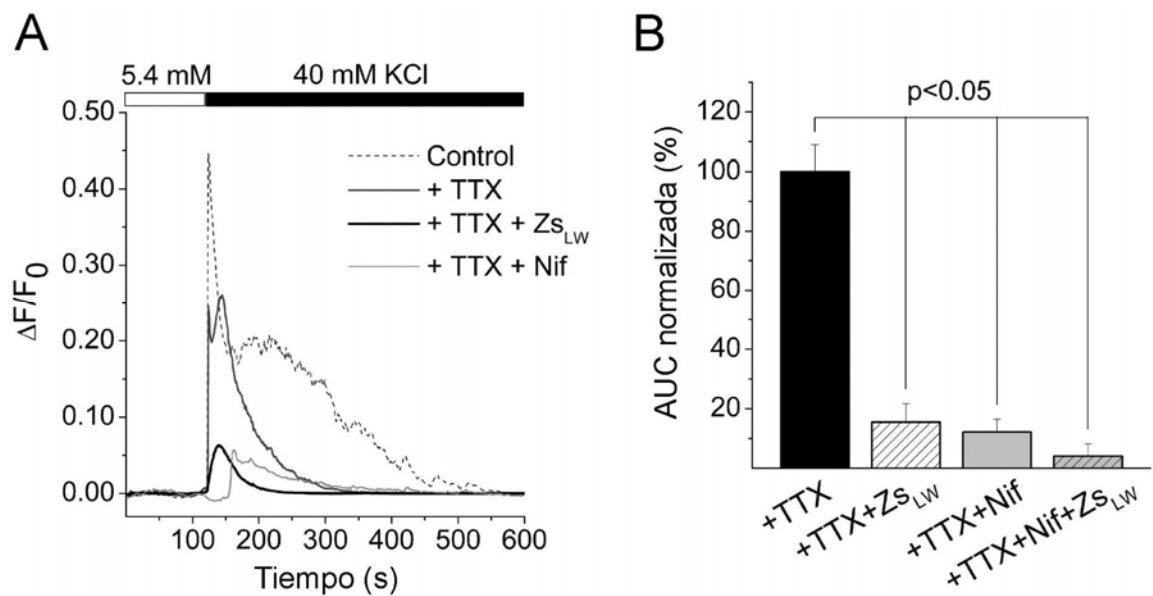
El incremento de la concentración extracelular de glucosa de 5.6 a 25.6 mM indujo un aumento de la fluorescencia del indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  Fluo-4AM, la cual permaneció elevada sobre sus valores iniciales durante el tiempo de adquisición. Las áreas bajo las curvas de fluorescencia contra el tiempo se analizaron como una medida de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a las células. Al comparar los promedios de las áreas bajo las curvas se observó que las células tratadas con la fracción  $Z_{s_{LW}}$  presentaron valores menores que los correspondientes controles, mientras que con el lavado de la toxina se recuperó parcialmente la capacidad de respuesta a la glucosa (**Figura 6**).

### **La fracción de bajo peso molecular de *Z. sociatus* inhibe el incremento del $\text{Ca}^{2+}$ intracelular en respuesta a la despolarización con KCl**

La despolarización con alto potasio (40 mM KCl) incrementó la fluorescencia sensible a  $\text{Ca}^{2+}$  en las células beta aisladas. En esta condición, el bloqueador de canales de  $\text{Na}^+$  TTX (100 nM) disminuyó las señales observadas. Sin embargo, la fracción  $Z_{s_{LW}}$  (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) redujo las señales aún más, de forma similar al bloqueador de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  nifedipina (10  $\mu\text{M}$ ). Además, el efecto de la aplicación simultánea del fármaco y la fracción activa no difirió estadísticamente de los efectos observados cuando se aplicaron independientemente (**Figura 7**).



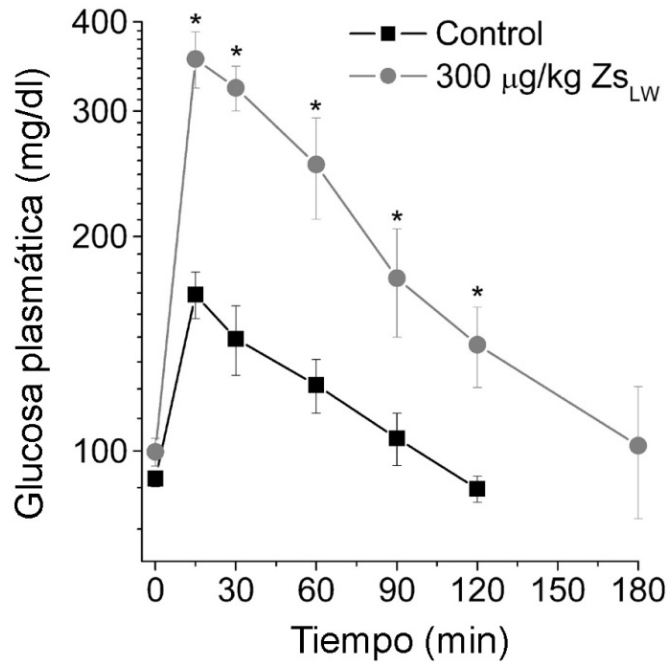
**Figura 6.** La fracción de bajo peso molecular de *Z. sociatus* inhibe la elevación del calcio intracelular estimulada por glucosa. **(A)** Trazos representativos del incremento de la fluorescencia sensible a Ca<sup>2+</sup>, estimulada por glucosa, en condiciones control (C) y con el tratamiento con la fracción de bajo peso molecular de *Z. sociatus* (Zs<sub>LW</sub>, 50 μg/ml). **(B)** Comparaciones de las áreas bajo las curvas (AUC, según sus siglas del inglés *areas under the curves*) en cada condición (N=7, 9 y 4 para el Control, Zs<sub>LW</sub> y el lavado de la toxina respectivamente). Los valores de las barras representan el promedio ± SEM.



**Figura 7.** La fracción de bajo peso molecular de *Z. sociatus* inhibe la elevación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular estimulada por alto KCl. **(A)** Trazos representativos del incremento de la fluorescencia sensible a  $\text{Ca}^{2+}$ , estimulada por 40 mM KCl, en condiciones control (C), en células tratadas con 100 nM TTX, con TTX y la fracción de bajo peso molecular de *Z. sociatus* ( $Z_{sLW}$ , 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y con nifedipina (Nif, 10  $\mu\text{M}$ ). **(B)** Comparaciones de las áreas bajo las curvas normalizadas entre los tratamientos con TTX (N=12), TTX+  $Z_{sLW}$  (N=9) o Nif (N=6), así como la combinación de todos los tratamientos (N=5). Los valores de las barras representan el promedio  $\pm$  SEM.

## **La fracción de bajo peso molecular de *Z. sociatus* causa intolerancia a la glucosa *in vivo***

Los animales inoculados con una dosis de 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de la fracción  $Z_{S_{LW}}$  presentaron valores de glucosa elevados respecto a los controles inoculados solamente con vehículo en todos los tiempos evaluados de la prueba de tolerancia a la glucosa. Además, el tiempo que tardaron en recuperar los niveles de glucosa iniciales se retrasó en una hora respecto a los controles (**Figura 8**). El grado de intolerancia a la glucosa en relación a las ratas controles se determinó comparando las áreas bajo las curvas. En ese sentido, las ratas tratadas con la fracción  $Z_{S_{LW}}$  mostraron un incremento de aproximadamente 1.8 veces en el área bajo la curva, cuando sólo se analizó desde el tiempo 0 hasta el minuto 120.

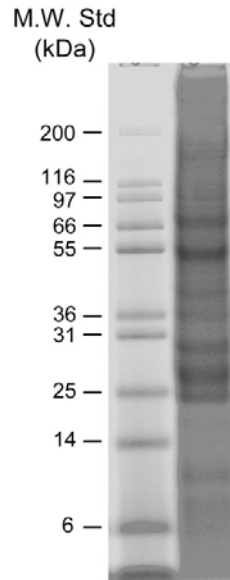


**Figura 8. Prueba de tolerancia a la glucosa administrada intraperitonealmente.** La gráfica muestra los niveles de glucosa en sangre de ratas, antes y después de la inoculación de una dosis de 2 mg/kg a animales control e inoculados con la fracción de bajo peso molecular de *Z. sociatus* ( $Z_{S_{LW}}$ , 300 µg/kg). Estos últimos presentaron mayores niveles de glucosa en todos los puntos analizados y recuperaron sus niveles basales una hora después que los controles. Los valores de los puntos representan el promedio  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  para las comparaciones entre ambos grupos para cada tiempo.

### **Análisis electroforético del extracto crudo de *Physalia physalis***

El extracto crudo de *P. physalis* (Pp<sub>ce</sub>) fue disuelto en 20 mM Tris-HCl pH 8.0 y analizado mediante una electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE en condiciones reductoras. La tinción con Azul Coomassie Brillante R-250 reveló una mezcla compleja de compuestos de alto y bajo peso molecular, que se dividió en tres zonas principales (**Figura 9**). En la primera, una zona de alto peso molecular desde 200 a 55 kDa, se observan dos bandas intensas a 66 y 55 kDa. La segunda contiene señales en los pesos moleculares entre 40 y 25 kDa donde se observan tres bandas entre 30 y 25 kDa que migran muy cerca entre sí. Finalmente, la tercera zona correspondió a compuestos de bajo peso molecular cuyas bandas fueron visibles entre 10 y 6 kDa, los cuales no se resolvieron adecuadamente y aparecen como una banda difusa.

Con este extracto se realizaron pruebas de tolerancia a la glucosa administrada intraperitonealmente, así como un análisis de sus efectos sobre la secreción de insulina mediante RHPA.



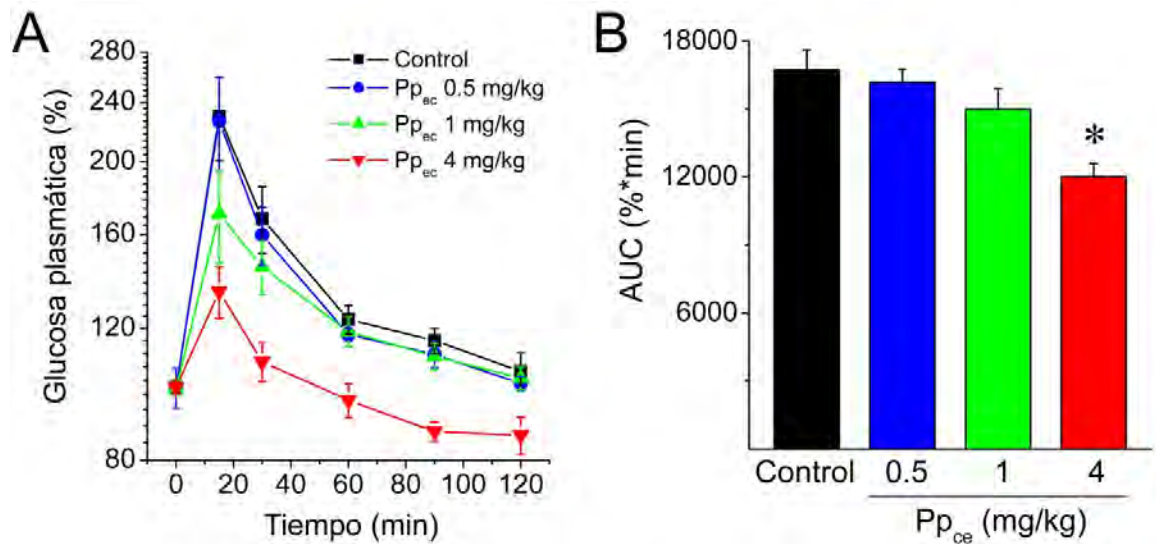
**Figura 9. Perfil electroforético SDS-PAGE de las proteínas solubles del extracto crudo de *P. physalis*.** En la figura se muestra el carril de la electroforesis de *P. physalis* y los pesos moleculares de las proteínas estándares a su izquierda. El gel separador en este caso fue de 16% de acrilamida.

### **El extracto crudo de *Physalia physalis* reduce los niveles de glucosa *in vivo***

El efecto del extracto crudo de *P. physalis* (Pp<sub>ce</sub>) en una prueba de tolerancia a la glucosa se ensayó a tres dosis de 0.5, 1 y 4 mg/kg. Se observó una tendencia a disminuir los niveles de glucosa en función de la dosis, que resultó en una disminución significativa (28%) del área bajo la curva a la máxima dosis (**Figura 10**). La propiedad del veneno de reducir los niveles de glucosa se puede deber, en



principio, a un aumento en la secreción de insulina por las células beta pancreáticas, por lo tanto, el extracto crudo se ensayó en el RHPA.

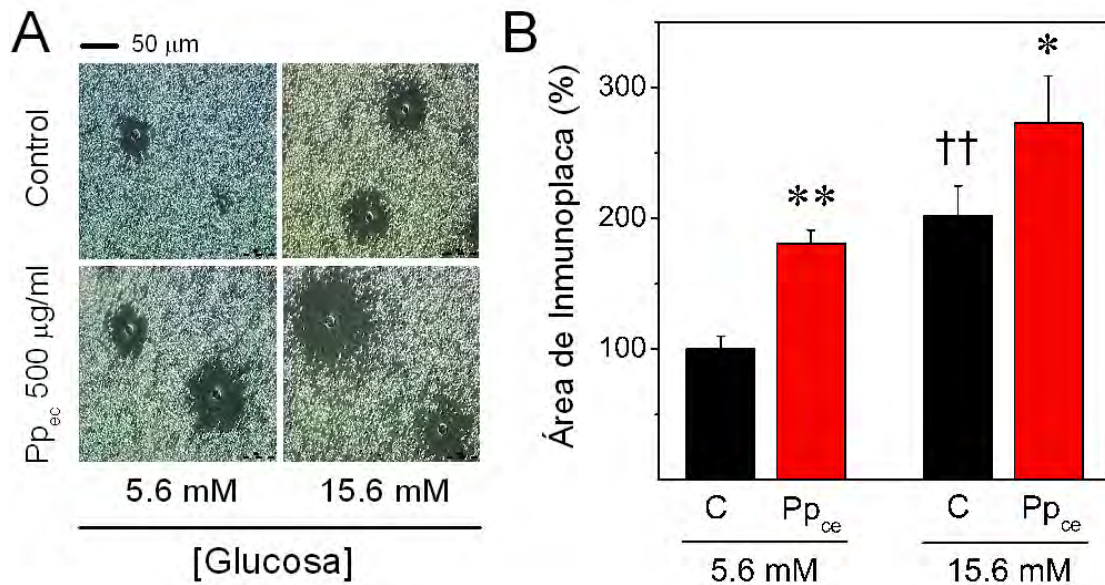


**Figura 10. Efecto del extracto crudo de *P. physalis* en la prueba de tolerancia a la glucosa administrada intraperitonealmente. (A)** Curvas de tolerancia a la glucosa de animales control (C) y tratados con el extracto crudo de *P. physalis* (Pp<sub>ce</sub>) a las dosis de 0.5 (N=4), 1 (N=7) y 4 mg/kg (N=3). **(B)** Comparación entre las áreas bajo las curvas (AUC) en cada condición. A la dosis máxima (Pp<sub>ce</sub>) redujo a un 72% el AUC respecto a los controles con una \* p < 0.05. Los valores de los puntos representan el promedio ± SEM de las glucosas normalizadas respecto al valor basal, que fue de 104 ± 10 mg/dl.

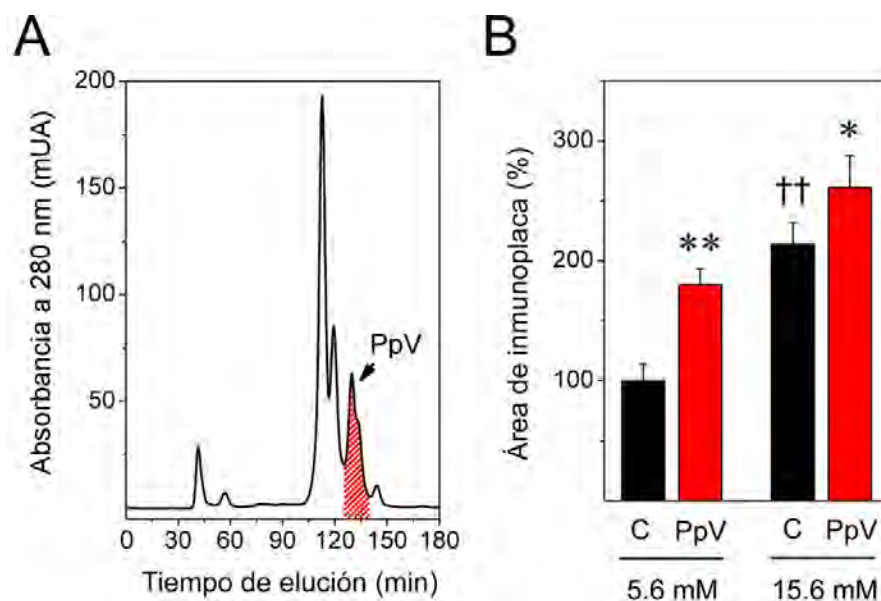
### **Purificación de toxinas de *Physalia physalis*, orientada mediante el RHPA**

El extracto crudo de *P. physalis* (Pp<sub>ce</sub>) se evaluó sobre la secreción de insulina de células beta aisladas de rata, mediante RHPA. Las células fueron incubadas en presencia de glucosa extracelular a concentraciones de 5.6 y 15.6 mM, las cuales se asemejan a los niveles circulantes de glucosa basal y posprandial respectivamente. Se observó que el extracto crudo de *P. physalis* (500 µg/ml) aumentó el AIP alrededor de las células beta en ambas condiciones (**Figura 11**), aunque de manera más notable a 5.6 mM de glucosa (aproximadamente un 80%). Esto pudiera explicar la reducción significativa de los niveles de glucosa ( $p < 0.05$ ) en la curva de tolerancia a la glucosa (a los 90 y 120 min), de ratas tratadas con 4 mg/kg de Pp<sub>ce</sub>.

Para aislar la(s) molécula(s) activa(s) del extracto crudo de *P. physalis*, se realizó un protocolo de purificación de dos pasos de cromatografías en columna: filtración en gel y HPLC en fase reversa con columna C18 (C18 RP-HPLC). El perfil cromatográfico de la filtración en gel en columna Superdex75 fue separado en seis fracciones principales (PpI, PpII, PpIII, PpIV, PpV y PpVI). Del análisis de estas fracciones para la secreción de insulina resultó que la PpV (300 µg/ml) exhibió un incremento de la secreción basal de 1.76 respecto al control, de manera similar a lo que se observó en el extracto crudo (**Figura 12**).

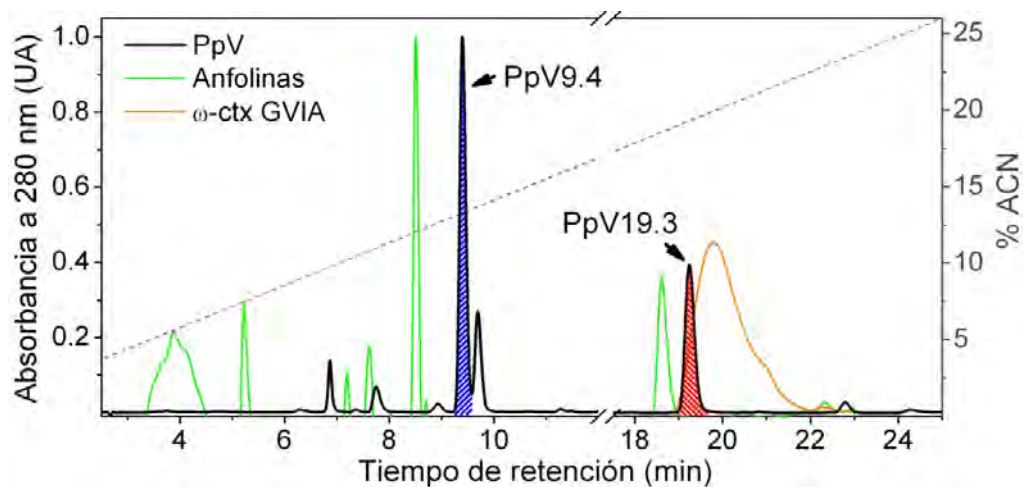


**Figura 11. Efectos del extracto crudo de *P. physalis* sobre la secreción de insulina en células beta pancreáticas aisladas. (A)** Micrografías representativas de las áreas de inmunoplasmas (AIP) medidas mediante un ensayo hemolítico inverso (RHPA). Barra de escala 50 µm. **(B)** Comparación de las AIP entre las condiciones experimentales en que fueron analizadas las células control (C) y las tratadas con el extracto crudo de *P. physalis* (Pp<sub>ec</sub>, 500 µg/ml). Las AIP se representan con barras, cuyos valores corresponden al promedio ± SEM de 3 experimentos independientes por duplicado, donde se contaron al menos 50 células por cada cámara. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 para las comparaciones entre las células control y las tratadas con Pp<sub>ec</sub> a la misma concentración de glucosa. †† p < 0.01 para las comparaciones entre las AIP a 5.6 y 15.6 mM en cada condición. Los valores fueron normalizados respecto a la AIP en 5.6 mM de glucosa de las células controles (1897 ± 192 µm<sup>2</sup>).



**Figura 12.** La fracción de bajo peso molecular PpV del extracto crudo de *P. physalis* potencia la secreción de insulina en células beta pancreáticas aisladas. **(A)** El cromatograma a 280 nm, obtenido mediante filtración en gel, muestra una región sombreada que corresponde a la fracción PpV. **(B)** Efecto de la fracción PpV sobre la secreción de insulina en el RHPA. Se muestran las comparaciones de las AIP entre las condiciones experimentales en que fueron analizadas las células control (C) y las tratadas con la fracción PpV (300  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Las AIP se representan con barras, cuyos valores corresponden al promedio  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes por duplicado, donde se contaron al menos 50 células por cada cámara. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  para las comparaciones entre las células control y las tratadas con PpV a la misma concentración de glucosa. ††  $p < 0.01$  para las comparaciones entre las AIP a 5.6 y 15.6 mM en cada condición. Los valores fueron normalizados respecto a la AIP en 5.6 mM de glucosa de las células controles ( $1769 \pm 247 \mu\text{m}^2$ ).

La fracción PpV se purificó posteriormente mediante RP-HPLC en una columna C18. Un pico prominente y cuatro picos minoritarios se distinguieron en el cromatograma obtenido a 280 nm (**Figura 13**). El pico mayoritario tuvo un tiempo de retención de 9.4 min y una débil actividad potenciadora de la insulina, mientras que el pico que eluyó a 19.3 min tuvo una actividad superior. La **Tabla 1** muestra los parámetros de purificación de ambas toxinas. Después de la purificación, el nivel de recuperación de estas toxinas a partir del extracto crudo fue del 3% y el 12% para PpV9.4 y PpV19.3 respectivamente. Además, tanto este parámetro como el factor de purificación se pueden considerar satisfactorios, en comparación con otras toxinas purificadas de cnidarios con el empleo de cromatografías similares (Uechi et al., 2011).



**Figura 13. Comatogramas de la fracción PpV del extracto crudo de *P. physalis*, obtenidos mediante RP-HPLC. (A)** Los picos sombreados del cromatograma a 280 nm, corresponden a aquellas toxinas con actividad potenciadora de la secreción de insulina. Las toxinas se nombraron PpV9.4 y PpV19.3 de acuerdo a sus tiempos de retención, los cuales fueron similares a un conjunto de acilpoliaminas relacionadas estructuralmente entre sí.

**Tabla 1. Esquema de purificación de las toxinas PpV9.4 y PpV19.3 aisladas a partir del extracto crudo de *P. physalis*.**

Fracción	Volumen (ml)	Muestra (mg)	Actividad total (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento* (%)	Factor de purificación*
Extracto Pp <sub>ce</sub>	80	207	92800	448	100	1
PpV	720	83	69840	841	75	1.9
PpV9.4	308	1.6	2772	1733	3	3.9
PpV19.3	881	3.1	11453	3695	12	8.2

\*Los niveles de recuperación se expresan como porcentaje de la actividad total inicial y los factores de purificación se calculan sobre la base de las actividades específicas.

## Las toxinas de *Physalia physalis* incrementan el porcentaje de células secretoras

La toxina PpV9.4 indujo un ligero aunque no significativo aumento de las AIP cuando se aplicó a una concentración de 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ( $1447 \pm 74 \mu\text{m}^2$  versus  $1331 \pm 59 \mu\text{m}^2$  de los controles, N=3, por duplicado), sin embargo duplicó las AIP a una concentración de 130  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en un medio con 5.6 mM de glucosa. Por otra parte, la toxina PpV19.3 alcanzó un nivel similar de actividad a la menor concentración. Ambas toxinas, a sus correspondientes concentraciones estimulantes, también aumentaron la fracción de células secretoras, lo cual causó que incrementaran el índice de secreción en 2.4 (PpV9.4) y 2.1 veces (PpV19.3), como reflejo de sus efectos en la secreción de insulina en general (**Tabla 2**).

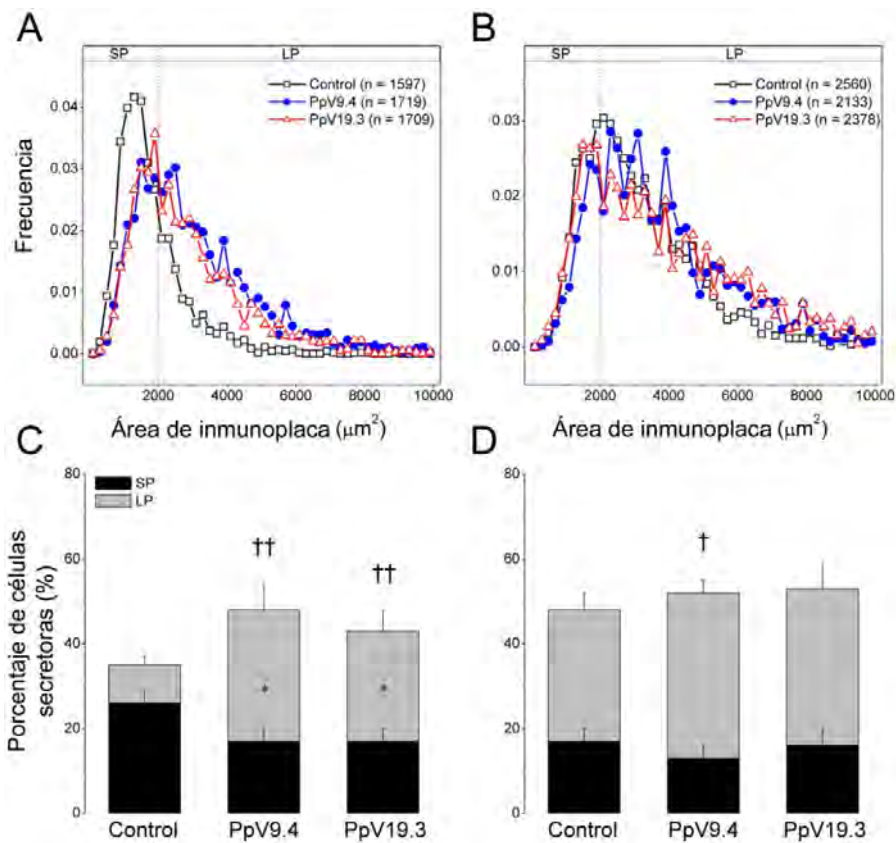
**Tabla 2. Las toxinas aisladas a partir de *P. physalis* potencian la secreción global de insulina (N=5 por duplicado), medida como el índice de secreción (IS) a través del aumento de las AIP y la fracción de células secretoras (F).**

	AIP ( $\mu\text{m}^2$ )		F		IS ( $\mu\text{m}^2$ )	
	5.6 mM	15.6 mM	5.6 mM	15.6 mM	5.6 mM	15.6 mM
<b>Control</b>	1704 $\pm$ 116	2903 $\pm$ 231 <sup>††</sup>	0.35 $\pm$ 0.01	0.49 $\pm$ 0.01 <sup>††</sup>	587 $\pm$ 37	1420 $\pm$ 119 <sup>††</sup>
<b>PpV9.4</b>	2807 $\pm$ 242 <sup>**</sup>	3449 $\pm$ 212 <sup>*</sup>	0.49 $\pm$ 0.02 <sup>**</sup>	0.51 $\pm$ 0.03	1413 $\pm$ 207 <sup>**</sup>	1766 $\pm$ 133 <sup>*</sup>
<b>PpV19.3</b>	2795 $\pm$ 184 <sup>**</sup>	3547 $\pm$ 429 <sup>*</sup>	0.43 $\pm$ 0.02 <sup>**</sup>	0.53 $\pm$ 0.03	1218 $\pm$ 130 <sup>**</sup>	1913 $\pm$ 275 <sup>*</sup>

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  para las comparaciones entre las células control y las tratadas con PpV a la misma concentración de glucosa. <sup>††</sup>  $p < 0.01$  para las comparaciones entre las mediciones analizadas a 5.6 y 15.6 mM en cada condición.

El análisis de las subpoblaciones de células beta secretoras mostró que el reclutamiento de una fracción silente de estas por las toxinas, cuando fueron incubadas con 5.6 mM de glucosa, se acompañó de un desplazamiento de la subpoblación de placas pequeñas (SP) a las de placas grandes (LP). A 15.6 mM de glucosa, el efecto potenciador de la secreción de insulina recayó fundamentalmente sobre el aumento en las AIP sin alteraciones de la fracción total de células secretoras, aunque la toxina PpV9.4 cambió la proporción de células LP y SP respecto al control (**Figura 14**).

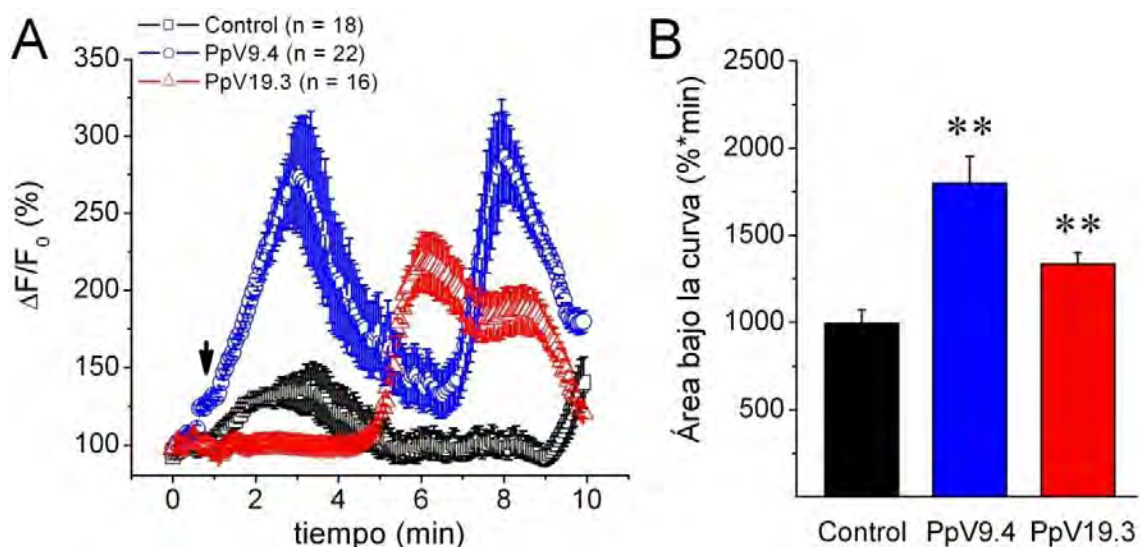




**Figura 14.** Las toxinas activas de *P. physalis* incrementan el porcentaje de células secretoras. **(A, B)** Histogramas de las AIP de las células control y las tratadas con las toxinas, tras ser incubadas en 5.6 y 15.6 mM de glucosa. Las frecuencias se calcularon mediante la división del número de células con AIP desde 0 a 10000  $\mu\text{m}^2$ , en intervalos de 250  $\mu\text{m}^2$ , sobre el total de células secretoras, y luego se multiplicó el resultado por la F correspondiente. **(C, D)** Los porcentajes de células del tipo SP y LP se muestran para cada condición como barras que representan la media  $\pm$  SEM de 5 experimentos por duplicado, donde se contaron aproximadamente 150 células por cámara. Las concentraciones de las toxinas PpV9.4 y PpV19.3 fueron de 130 y 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$  respectivamente. \*  $p < 0.05$  para las comparaciones entre las células control y tratadas con toxina; †  $p < 0.05$ , ††  $p < 0.01$  para las comparaciones entre las subpoblaciones de células LP en las mismas condiciones.

### Las toxinas de *Physalia physalis* incrementan el $\text{Ca}^{2+}$ intracelular

El efecto potenciador de las toxinas de la fracción PpV sobre la secreción basal no parecía estar relacionado con los principales blancos de las toxinas de cnidarios: los canales iónicos sensibles a voltaje (Honma and Shiomi, 2006), los cuales contribuyen significativamente a la despolarización de las células beta y la exocitosis de insulina estimulada por glucosa (Hiriart and Aguilar-Bryan, 2008). Basado en esto, se analizó la respuesta a las toxinas en las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en condiciones de glucosa 5.6 mM, y en presencia de TTX (100 nM),  $\text{NiCl}_2$  (300  $\mu\text{M}$ ), nifedipina (10  $\mu\text{M}$ ) y  $\omega$ -conotoxina GVIA (100 nM), los cuales bloquean los canales sensibles a voltaje de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , y entre estos últimos los de tipo T, L y N, respectivamente. En estas condiciones, PpV9.4 (130  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) causó un incremento inmediato de las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras PpV19.3 (60  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) aumentó el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular aproximadamente 2 min tras la aplicación de la toxina (**Figura 15**). Las áreas bajo las curvas se integraron desde el punto de aplicación de las toxinas o el vehículo hasta los 10 min de registro, y luego fueron comparadas. Ambas toxinas incrementaron estadísticamente este indicador del aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, de manera similar al aumento observado en la secreción de insulina.



**Figura 15. Las toxinas activas de *P. physalis* incrementan el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular de las células beta pancreáticas. (A)** Trazos promedios de los cambios relativos de la fluorescencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en células controles y tratadas con las toxinas, incubadas a 5.6 mM de glucosa. La flecha indica el momento en que se aplicaron las toxinas o el vehículo. **(B)** Comparación de las áreas bajo las curvas (AUC). Las concentraciones de las toxinas PpV9.4 y PpV19.3 fueron de 130 y 60  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente. Las barras representan la media  $\pm$  SEM, \*\*  $p < 0.01$  para las comparaciones entre las células control y las tratadas con toxinas.

### Caracterización bioquímica de las toxinas de *Physalia physalis*

El espectro de masas MALDI de la toxina PpV9.4 mostró un pico intenso con una relación  $m/z$  de 550.7 Da, junto a dos picos menos abundantes (Díaz-García et al., 2012). Esto probablemente ocurrió debido a la presencia de pequeñas cantidades de compuestos que eluyeron cercanos a esta toxina. El peso molecular de PpV9.4 se

encuentra en el mismo orden de otros compuestos bioactivos descritos en el filo como los diterpenoides (Chen et al., 2010; Chen et al., 2011), sesquiterpenoides (Su et al., 2010), biscembranoides (Yan et al., 2010) y esteroides (Chai et al., 2010). De manera similar a las moléculas mencionadas, PpV9.4 pudiera ser una molécula pequeña que presente tanto propiedades hidrofóbicas e hidrofílicas, de acuerdo a sus tiempos de elución en la cromatografía HPLC en fase reversa con columna C18. Por otro lado, el espectro de masas de la toxina PpV19.3 mostró una  $m/z$  de 4720.19 Da, cuya señal es muy parecida a los pesos moleculares de las toxinas peptídicas de cnidarios, generalmente entre 3 y 7 kDa (Castaneda and Harvey, 2009; Moran et al., 2009).

Para explorar la naturaleza peptídica de la toxina PpV19.3 y para obtener alguna información sobre la estructura de PpV9.4, se utilizó la degradación de Edman con el fin de determinar los residuos en el extremo N-terminal de ambas toxinas. El análisis de PpV9.4 reveló un pico principal que eluyó a los 8.62 min cerca del tiempo de retención característico de la fenilhidantoína (PTH)-asparagina, aunque la identificación total no fue posible (Diaz-Garcia et al., 2012). Sin embargo, no se puede descartar que este pico corresponda a algún aminoácido modificado. Por otra parte, otro pico de PpV9.4 se identificó como PTH-triptófano.

En contraste con lo anterior, la degradación de Edman de la toxina PpV19.3 reveló la presencia de leucina y triptófano en los dos primeros ciclos, además de dos

picos sin identificar con tiempos de elución de 8.88 y 12 min, los cuales no se superpusieron a ninguno de los estándares de PTH-aminoácidos. Por lo tanto, estos resultados sugieren que PpV19.3 pudiera ser una nueva clase de toxinas marinas con aminoácidos modificados en su estructura. Para corroborar la presencia de algunos de los residuos identificados en las estructuras de las toxinas mediante la degradación de Edman, estas fueron hidrolizadas exhaustivamente con HCl (3N) a 37 °C durante 8 horas, y luego analizadas por C18 RP-HPLC. Los perfiles cromatográficos de estas se compararon con aquellos obtenidos para el triptófano y la tirosina. Numerosos picos se observaron para la toxina PpV19.3, que exhibió un perfil más complejo que PpV9.4 (Diaz-Garcia et al., 2012). En el perfil de Pp19.3 se detectó la presencia de ambos aminoácidos estándares, mientras que para PpV9.4 no se pudo encontrar coincidencias con los aminoácidos utilizados, quizás por la oxidación de los residuos.

## DISCUSIÓN

### **Efectos del extracto crudo y la fracción de bajo peso molecular de *Zoanthus sociatus* sobre las células beta pancreáticas**

El efecto del veneno del cnidario *Zoanthus sociatus* se probó sobre la secreción de insulina y se observó una inhibición sobre la secreción de insulina estimulada por glucosa (15.6 mM) en células beta aisladas de rata. Esto sugiere la presencia de moduladores de canales iónicos en dicho veneno sensibles a voltaje, pues estos controlan las oscilaciones eléctricas y del calcio intracelular responsables de la liberación de la hormona en respuesta a la glucosa.

Debido a la heterogeneidad en la composición del extracto crudo de *Z. sociatus*, con compuestos de una amplia gama de pesos moleculares, se utilizó una cromatografía de filtración en gel en columna Superdex75. Las fracciones activas colectadas absorbieron en la región ultravioleta del espectro (280 nm) y comprendieron una mezcla de compuestos con bajo peso molecular. Interesantemente los pesos moleculares de moléculas presentes en el veneno, que pudieron ser determinados en la preparación sometida a espectrometría de masas por ESI, estuvieron en el intervalo donde se han descrito numerosas neurotoxinas en el filo Cnidaria, entre 3 y 6.5 kDa (Castaneda and Harvey, 2009; Moran et al., 2009).

Sin embargo, no se puede descartar que el efecto observado se deba a otros compuestos de naturaleza no proteica, cuyas masas no fueron detectadas con el método empleado. Recientemente se han analizado, mediante espectrometría de masas MALDI, a los componentes de las fracciones de bajo peso molecular de *Z. sociatus* obtenidas por filtración en gel en columna Sephadex-G50 (Dominguez-Perez et al., 2013). Interesantemente, estos autores reportaron la presencia de varias moléculas cuyos pesos moleculares fueron similares a los de este trabajo, y describieron además numerosas toxinas no peptídicas de bajo molecular. Estos hallazgos sustentan la posibilidad de que más de una molécula, peptídica o no, pudieran ser responsables de las actividades observadas en estas fracciones. No obstante, la detección de compuestos con pesos moleculares similares a las neurotoxinas descritas en el filo resulta alentadora, considerando la versatilidad de actividades descritas en estas.

Además, las toxinas de cnidarios generalmente presentan una estructura compacta debido a la presencia de varios enlaces disulfuro y otros motivos que determinan un plegamiento particular, no sólo en cnidarios, sino en otros grupos más distantes filogenéticamente (Mouhat et al., 2004). A fin de identificar moléculas con características similares a estos péptidos pequeños, se realizó un análisis cromatográfico del extracto crudo y la fracción activa por C18 RP-HPLC. A partir de esto se obtuvieron varios picos cuyos tiempos de retención estuvieron

comprendidos entre la  $\omega$ -conotoxina y la insulina, las cuales constituyen péptidos compactos y pequeños, similares en estas propiedades a las neurotoxinas de cnidarios. La fracción  $Z_{S_{LW}}$  mostró una elevada abundancia de picos en la región entre 20 y 40% de acetonitrilo (ACN), precisamente el intervalo comprendido por la elución de los dos estándares utilizados, lo cual sugiere la presencia de estructuras relacionadas a estos en la fracción activa.

La inhibición de la secreción de insulina observada en el tratamiento con la fracción de bajo peso molecular fue similar a la del extracto crudo, pero la fracción  $Z_{S_{LW}}$  causó una inhibición mayor (20%) a la misma concentración, lo que pudiera estar asociado a una ganancia en la pureza de los componentes activos tras la filtración en gel.

La inhibición de la secreción de insulina en general se puede estimar por el índice de secreción (Hiriart et al., 2001), el cual resulta de la multiplicación del área de inmunoplaca promedio y la fracción de células secretoras. La fracción  $Z_{S_{LW}}$  disminuyó tanto la AIP como la F cuando se incubó en presencia de 15.6 mM de glucosa, lo cual también resultó en una reducción de índice de secreción de aproximadamente 77%. Muchos moduladores endógenos como factores de crecimiento, hormonas y neurotransmisores, así como sustancias exógenas, afectan también la secreción promedio de las células beta y el porcentaje de estas que responden a un estímulo de glucosa (Díaz-García et al., 2010).



El hecho de que la inhibición por  $Z_{S_{LW}}$  ocurriera fundamentalmente en presencia de 15.6 mM de glucosa era sugerente de la participación de canales iónicos, pues estos controlan la excitabilidad y la exocitosis de las células beta. Para determinar si este era el caso, se analizó el efecto de la fracción sobre las dinámicas de calcio estimuladas por alta glucosa (25.6 mM) y por la despolarización con KCl (40 mM). En condiciones control, la estimulación con glucosa aumentó las señales de calcio intracelular. En las células tratadas con  $Z_{S_{LW}}$  este incremento en la fluorescencia sensible a calcio fue significativamente menor que los controles, y se recuperó en gran medida tras el lavado de la fracción activa, lo cual sugiere un efecto al menos parcialmente reversible de las toxinas.

Con el propósito de explorar el efecto de la fracción activa sobre los canales sensibles a voltaje, se analizaron las señales de calcio estimuladas con alto KCl. Se ha descrito que el alto KCl despolariza la membrana aproximadamente 40 mV en las células beta de ratón (Hatlapatka et al., 2009). La despolarización activa directamente los canales sensibles a voltaje que controlan la actividad eléctrica de las células beta y los flujos de calcio que determinan la exocitosis de los gránulos de insulina (Hiriart and Aguilar-Bryan, 2008).

Cuando los canales de  $Na^+$  fueron bloqueados con TTX (100 nM), las señales de calcio se redujeron con respecto al control, lo que apoya las evidencias previas sobre la relevancia de estos canales en la fisiología pancreática (Hiriart and Matteson,

1988). El componente remanente de la señal, atribuido fundamentalmente a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensible a voltaje, fue en efecto disminuido significativamente tras la aplicación de nifedipina ( $10 \mu\text{M}$ ), un bloqueador de los canales tipo L (Malaisse and Boschero, 1977). Asimismo, la fracción  $\text{Zs}_{\text{LW}}$  ( $50 \mu\text{g/ml}$ ) redujo las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  hasta un punto similar al de la nifedipina, sin que se pudiera detectar un sinergismo entre ambos. Esto sugiere que comparten un blanco molecular en común, aunque, de acuerdo a los resultados presentes, no se puede descartar un efecto indirecto de  $\text{Zs}_{\text{LW}}$  sobre los flujos de  $\text{Ca}^{2+}$ .

A pesar de que la mayoría de las neurotoxinas descritas en cnidarios actúan sobre canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  sensibles a voltaje (Honma and Shiomi, 2006), en algunas especies se han descrito actividades sobre otras familias de canales como los TRP (Cuypers et al., 2006) y (Andreev et al., 2008) y los canales sensibles a pH (Diochot et al., 2004). En ese sentido, los resultados obtenidos para la fracción  $\text{Zs}_{\text{LW}}$  sugieren que se trata de una actividad que afecta, directa o indirectamente a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a voltaje.

Finalmente, se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa para determinar si los efectos observados en las células beta aisladas de rata podrían manifestarse en un modelo *in vivo*. Para esto se seleccionó una dosis de  $300 \mu\text{g/kg}$  de la fracción de bajo peso molecular de *Z. sociatus*, la cual no resultó letal en ningún animal, de manera similar a otros estudios en roedores (Dominguez-Perez et al., 2013). Las ratas

tratadas con la fracción  $Z_{S_{LW}}$  presentaron niveles de glucosa mayores que las ratas controles en todos los tiempos analizados. Además, el tiempo de recuperación en los animales tratados fue una hora mayor que los controles. Estas evidencias sugieren una disminución en la secreción y/o la sensibilidad a la insulina.

Los resultados *in vitro* obtenidos indican que la fracción activa de *Z. sociatus* impide una secreción de insulina adecuada en respuesta a la glucosa, lo cual pudiera explicar la hiperglucemia que se evidenció a partir de la curva de tolerancia a la glucosa. Lo observado es similar al desacoplamiento en el proceso de secreción estimulada por glucosa que ocurre cuando se afectan varios canales implicados en este, por ejemplo el TRPM5 (Colsoul et al., 2010), los canales de  $Na^+$  (Ernst et al., 2009) y los de  $Ca^{2+}$  sensibles a voltaje (Mears, 2004).

Además, resulta interesante mencionar que esta fracción pudiera afectar las fibras sensoriales o autónomas que inervan los islotes pancreáticos, así como otros tipos celulares que regulan la secreción de insulina o la sensibilidad a esta en los tejidos periféricos, de manera que a nivel sistémico el efecto de las toxinas sobre la homeostasis de la glucosa pudiera ser más generalizado. Es posible que el efecto observado en los flujos de  $Ca^{2+}$ , sea común a otros tejidos excitables, por lo cual la toxicidad de *Z. sociatus* pudiera causar desórdenes multifactoriales. En tal sentido, recientemente se ha descrito que la fracción de bajo peso molecular de *Z. sociatus*

causa síntomas de toxicidad cardiovascular e incluso resulta letal en ratones, aunque a dosis mayores que la utilizada en este trabajo (Dominguez-Perez et al., 2013).

### **Efectos del extracto crudo y la fracción de bajo peso molecular de *Physalia physalis* sobre las células beta pancreáticas**

Se conoce que el veneno de los tentáculos de *P. physalis* posee gran similitud con el de la hidra, sobre todo en cuanto a los efectos biológicos y a las toxinas de alto peso molecular (Sher and Zlotkin, 2009; Tamkun and Hessinger, 1981). Además, se ha propuesto que la hidra carece de las neurotoxinas peptídicas de canales de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> características de las anémonas (Oliveira et al., 2004; Sher and Zlotkin, 2009).

En el presente estudio se han aislado dos nuevas toxinas de bajo peso molecular a partir del extracto crudo de los tentáculos de *P. physalis*. Estas se designaron como PpV9.4 y PpV19.3 de acuerdo a sus tiempos de retención en cromatografía C18 RP-HPLC. La secuenciación por el extremo N-terminal mediante la reacción de Edman reveló la presencia de aminoácidos típicos de acilpoliaminas, así como otros residuos no identificados, que sugieren la presencia de modificaciones en su estructura, como ha sido descrito en *A. aculeate* (Matsunaga et al., 2011). Hasta el momento sólo la subunidad I del complejo citocromo oxidasa (Ortman et al., 2010), un canal de K<sup>+</sup> sensible a voltaje (GenBank: ABD59027.1) y la subunidad beta del canal de Ca<sup>2+</sup> activado por voltaje (GenBank: ABD59026.1) (Bouchard et al., 2006),

tres proteínas de alto peso molecular, son las únicas que han sido descritas y secuenciadas en esta especie. Hasta el momento no existe una toxina de bajo peso molecular secuenciada en esta especie, y el presente estudio es, hasta donde conoce el autor, la única aproximación a la estructura de estas.

Las toxinas que contienen poliaminas en su estructura por lo general son moléculas policationicas a pH fisiológicos, que modulan diversos receptores ionotrópicos. Este tipo de toxinas han sido identificadas por RP-HPLC en columna C18 como compuestos de bajo peso molecular que eluyen en gradientes lineales de ACN de 0 al 60% (v/v), entre los 10 y 30 min (Moore et al., 2009). Al respecto, la comparación de los tiempos de retención entre ambas toxinas aisladas de *P. physalis* y una mezcla de moléculas orgánicas relacionadas con las acilpoliaminas (las anfolinas), muestran tiempos de elución similares en las mismas condiciones cromatográficas. Lo anterior sugiere que pudieran existir similitudes entre la naturaleza química de ambas toxinas con las referidas acilpoliaminas.

Interesantemente, las acilpoliaminas suelen ser comunes en los venenos de arañas y constituyen un grupo de compuestos polares cuyos pesos moleculares por lo general son menores a 1 kDa, y que pueden modular receptores ionotrópicos a glutamato así como otros canales iónicos (Estrada et al., 2007; Scott et al., 1993). Sin embargo, recientemente se han descrito varias poliaminas de cadena larga e incluso una nueva familia de péptidos pequeños modificados postraduccionalmente con

cadena de poliaminas en la esponja marina *Axinyssa aculeate* (Matsunaga et al., 2011; Sufrin et al., 2009). Esto es un ejemplo de las nuevas estructuras que continúan descubriéndose en los organismos marinos, los cuales constituyen una fuente de compuestos inusuales que pudieran mostrar interacciones inesperadas con las células de mamíferos.

Las toxinas aisladas de *P. physalis* potencian la secreción de insulina mediante el aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol. El mecanismo exacto mediante el cual ejercen este efecto no llegó a ser dilucidado completamente, pero basados en la farmacología utilizada, se puede descartar la contribución de los canales de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a voltaje en las células beta. Posiblemente otros canales iónicos y/o vías de señalización que modulan la secreción de insulina pudieran estar afectados. En base a la evidencia de los ensayos de viabilidad, queda desechada la posibilidad de que la insulina haya sido masivamente liberada por procesos citotóxicos, debido a que ni las toxinas ni el extracto crudo causaron una pérdida significativa de la viabilidad celular (Diaz-Garcia et al., 2012).

En cuanto a este fenómeno sólo podemos especular que no parecen actuar de la misma manera, pues mientras PpV9.4 ejerce un incremento rápido en la fluorescencia sensible a calcio, el efecto de PpV19.3 es más tardado. Este retardo de PpV19.3 pudiera deberse a una acción mediada por receptores metabotrópicos o cascadas de señalización que causen el vaciamiento de reservorios intracelulares, los

cuales también regulan las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células beta (Cline et al., 2011; Oya et al., 2011).

Por otro lado, los efectos casi inmediatos de PpV9.4 sobre el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  pudieran deberse a la activación de canales permeables a este catión, como es el caso de varios canales TRP o los receptores ionotrópicos glutamatérgicos (Inagaki et al., 1995; Uchida and Tominaga, 2011a). Resulta notable que el extracto crudo de *P. physalis* sensibiliza al canal TRPV1 (Cuypers et al., 2006), uno de los canales TRP relacionados a la secreción de insulina (Hiriart and Aguilar-Bryan, 2008; Uchida and Tominaga, 2011a), pero cuya relevancia funcional en las células beta aún no está del todo clara (Islam, 2011). La controversia sobre este canal en las células beta no sólo es relevante para aventurar una hipótesis futura sobre el mecanismo de las toxinas descritas en este trabajo, sino que es importante en la identificación de nuevos blancos terapéuticos para la diabetes.

## CONCLUSIONES

En el presente estudio se demuestra por primera vez la capacidad moduladora sobre la secreción de insulina de los extractos de cnidarios. Sin embargo, las actividades y la naturaleza de las toxinas responsables mostraron una diversidad inesperada. En la fracción de bajo peso molecular de *Zoanthus sociatus*, responsable de un efecto inhibitorio sobre la secreción de insulina, se detectaron compuestos con pesos moleculares similares a los de las neurotoxinas de cnidarios. Además, el mecanismo mediante el cual se redujo la respuesta a la glucosa de las células beta pancreáticas incluye efectos sobre los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a voltaje. El grado de inhibición causado por esta fracción de bajo peso molecular es lo suficientemente potente para causar intolerancia a la glucosa *in vivo*, cuando esta es inoculada intraperitonealmente.

Por otra parte, se demostró que los tentáculos venenosos de *Physalia physalis* potencian la secreción de insulina. Se identificaron dos toxinas de bajo peso molecular con actividad potenciadora de la secreción de insulina, cuyas estructuras no son compatibles con las conocidas neurotoxinas peptídicas de cnidarios. Además, estas toxinas incrementan la excitabilidad de las células beta independientemente de los canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a voltaje.



En general, el presente estudio demuestra las potencialidades de los extractos de cnidarios en el descubrimiento de nuevas actividades biológicas de capital relevancia en la investigación biomédica, como es el caso de la secreción de insulina. También contribuye al conocimiento sobre la diversidad estructural en los compuestos bioactivos procedentes de cnidarios marinos, así como sus blancos moleculares en las células excitables.

## **SEGUNDA PARTE: PAPEL DEL CANAL TRPV1 EN LA SECRECIÓN DE INSULINA**

### **Planteamiento del problema**

Como se ha mencionado antes, el canal TRPV1 se ha relacionado con la fisiología de las células secretoras de insulina, aunque su papel en estas es aún controversial. Este canal actúa como un sensor de estímulos polimodales, pues es activado por temperaturas por encima de los 41 °C, pH extracelular ácido e intracelular básico, estrés mecánico y por la unión de ligandos tanto endógenos como exógenos (Morales-Lazaro et al., 2013). El canal TRPV1 se expresa en el sistema nervioso central y periférico, así como en otros tejidos no neuronales, donde desempeña un papel importante en la nociocepción y los procesos inflamatorios (Jara-Oseguera et al., 2008).

Se ha sugerido que el canal TRPV1 se expresa funcionalmente en varios insulinomas de rata, aunque su activación directa no se ha observado aún en cultivos primarios de células beta pancreáticas (Akiba et al., 2004; Jabin Fagelskiold et al., 2012). Además, este canal se ha relacionado con la regulación de la secreción de insulina y la inflamación del islote mediante las fibras sensoriales que inervan el islote, pero también con la resistencia a la insulina mediante mecanismos que no son comprendidos en su totalidad (Gram et al., 2007; Razavi et al., 2006).

Se ha observado, por ejemplo, que las ratas tratadas a largo plazo con capsaicina experimentan desensibilización de las fibras aferentes autónomas y presentan mayor sensibilidad a la insulina (Gram et al., 2007; Melnyk and Himms-Hagen, 1995). Además, se ha propuesto que los ratones *Trpv1<sup>-/-</sup>* presentan una mayor sensibilidad a la insulina respecto a los ratones de fenotipo silvestre (WT) (Razavi et al., 2006). Interesantemente, los ratones *Trpv1<sup>-/-</sup>* también son resistentes a la obesidad y la hipertensión inducida mediante una dieta rica en grasa y muestran una mejor tolerancia a la glucosa respecto a los animales obesos WT, los cuales apoya una posible participación del canal TRPV1 en la resistencia a la insulina en los tejidos periféricos (Marshall et al., 2012). No obstante, todavía no existen indicios del (o los) mecanismo(s) mediante el cual la actividad del canal TRPV1 regula la sensibilidad a la insulina.

En el presente estudio, se explora la función del canal TRPV1 en cultivos primarios de células betas pancreáticas, obtenidas de ratas neonatas y adultas, así como en la línea celular de insulinoma RINm5F. También se analiza el efecto de la ausencia de este canal en la secreción de insulina, a partir de la comparación de las respuestas a glucosa y otros estímulos como la despolarización con KCl, de células aisladas de ratones WT y *Trpv1<sup>-/-</sup>*. Asimismo se determinan los mecanismos que sustentan las diferencias en cuanto a la sensibilidad a la insulina entre ambos grupos de animales.

## **Hipótesis**

El canal TRPV1 no es intrínsecamente relevante en la fisiología de las células beta pancreáticas, pero regula la homeostasis de esta hormona a través del sistema nervioso autónomo y su control sobre la resistencia periférica a insulina.

## **Objetivo General**

Estudiar y caracterizar la función del canal TRPV1 en las células beta pancreáticas y en la resistencia periférica a la insulina.

## **Objetivos Específicos**

1. Detectar la actividad del canal TRPV1 en las células beta pancreáticas.
2. Analizar el efecto de la ausencia del canal en la secreción de insulina en células beta pancreáticas aisladas de ratones *Trpv1<sup>-/-</sup>*.
3. Comparar el estado metabólico de los ratones WT y *Trpv1<sup>-/-</sup>*.
4. Determinar el mecanismo mediante el cual el canal TRPV1 participa en la resistencia a la insulina.

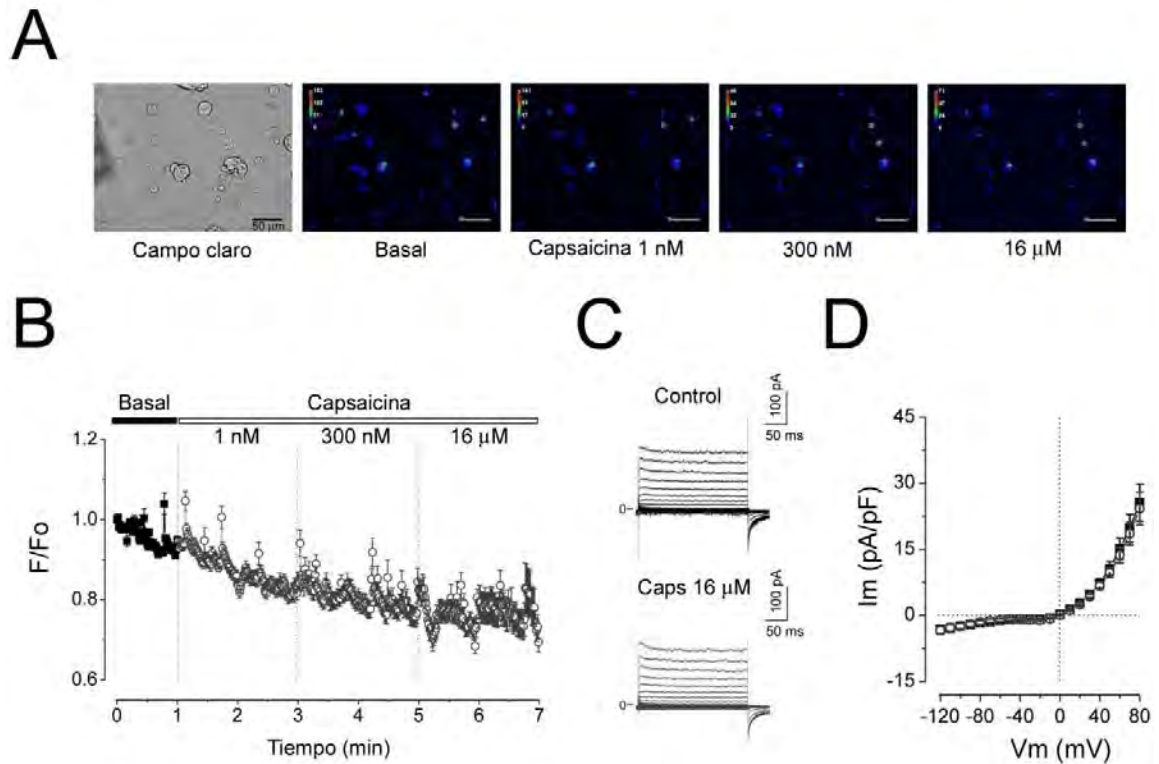
## RESULTADOS

### Las células beta pancreáticas no expresan canales TRPV1 funcionales

La capsaicina, un agonista del canal TRPV1 (Vetter and Lewis, 2011), se utilizó para detectar la presencia de corrientes catiónicas no selectivas o las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a este compuesto en células beta de ratas adultas, mediante técnicas electrofisiológicas y de microfluorimetría. Tres concentraciones de capsaicina (1 nM, 300 nM y 16  $\mu\text{M}$ ) fueron ensayadas en mediciones de fluorescencia sensible a  $\text{Ca}^{2+}$  (Akiba et al., 2004; Jabin Fagelskiold et al., 2012; Mergler et al., 2012; Waluk et al., 2012). La fluorescencia del indicador Fluo-4AM en células beta de ratas adultas no se incrementó tras la aplicación de ninguna de las concentraciones de capsaicina (**Figura 16A**). En efecto, el curso temporal de los valores de fluorescencia normalizados no mostró ninguna respuesta a capsaicina en estas células, y la única tendencia observada fue el fotoapagamiento del fluoróforo durante el tiempo de registro (**Figura 16B**).

Un resultado similar se obtuvo en los registros de las corrientes catiónicas no selectivas con el empleo de la técnica de patch-clamp en la configuración de célula entera. Los trazos obtenidos no difirieron entre antes y después de la aplicación de 16  $\mu\text{M}$  de capsaicina, una concentración saturante de este agonista del canal TRPV1 (**Figura 16C**). A partir de estos trazos se construyeron las correspondientes

relaciones corriente a voltaje (IV), las cuales mostraron una rectificación saliente y un potencial de reversión aproximadamente igual a 0 mV (**Figura 16D**), de forma similar a los registros de corriente catiónicas no selectivas en células beta descritos previamente con el empleo de soluciones isométricas de Na<sup>+</sup> (Colsoul et al., 2010). Aunque el mRNA de Trpv1 se ha detectado en islotes pancreáticos (Akiba et al., 2004), la similitud entre las curvas IV de las células beta de rata en ausencia y presencia de capsaicina, sugiere que estos canales no se expresan de manera funcional en la membrana plasmática de estas células.



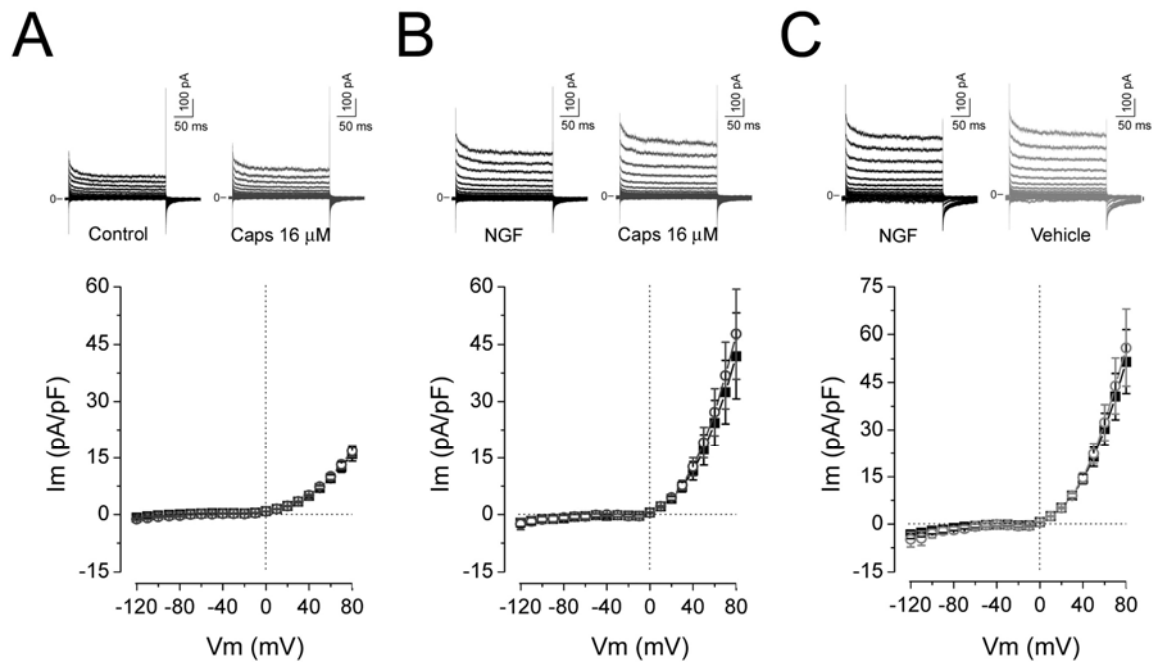
**Figura 16.** Las corrientes catiónicas no selectivas de cultivos primarios de células beta de rata son insensibles a la capsaicina, un agonista del canal TRPV1. **(A)** Micrografías de la emisión de fluorescencia del indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  Fluo-4AM antes (Basal) y después de la exposición a concentraciones crecientes de capsaicina. Las imágenes de fluorescencia se obtuvieron mediante el promedio de imágenes durante los tiempos de adquisición. **(B)** Curso temporal de la variación en la fluorescencia de las células beta antes (Control) y después de la aplicación de capsaicina (N=22). **(C)** Trazos de corriente representativos de células beta adultas antes (Control) y después de la aplicación de capsaicina (Caps 16  $\mu\text{M}$ ). **(D)** Relaciones corriente a voltaje de células beta de ratas adultas (N=16) Control (cuadrados sombreados) y tratadas con Caps 16  $\mu\text{M}$  (círculos).

## **La capsaicina no activa canales TRPV1 en células beta de ratas neonatas**

Los canales TRPV1 funcionales se han descrito en varias líneas celulares y tumores, los cuales son células desdiferenciadas (Jabin Fagelskiold et al., 2012; Mergler et al., 2012). Por tanto, TRPV1 podría funcionar como un marcador de células inmaduras. Es por eso que el efecto de la capsaicina fue analizado en células beta de ratas neonatas, las cuales se caracterizan por un proceso defectuoso de secreción de insulina estimulada por glucosa (Navarro-Tableros et al., 2007b). En estos experimentos, la capsaicina (16  $\mu$ M) tampoco activó las corrientes en las células beta de ratas neonatas (**Figura 17A**).

El factor de crecimiento neuronal (NGF) se ha descrito como un inductor de la expresión y/o la sensibilización de canales iónicos en las células beta pancreáticas (Rosenbaum et al., 2001; Vidaltamayo et al., 2002). Se ha demostrado además que el NGF potencia las corrientes a través del canal TRPV1 en sistemas de expresión heterólogos y nativos (Stein et al., 2006) y mejora la excitabilidad de las células neonatas, en parte, mediante el incremento de la expresión de canales de  $Ca^{2+}$  sensibles a voltaje (Navarro-Tableros et al., 2007b). Basado en lo anterior, las células beta neonatas se incubaron durante 48 h con NGF (50 ng/ml) y posteriormente se les aplicó capsaicina. Los resultados no muestran diferencias entre las células expuestas a capsaicina y las células expuestas al vehículo en el cual se disolvió la capsaicina (0.4% etanol final) (**Figura 17B,C**).

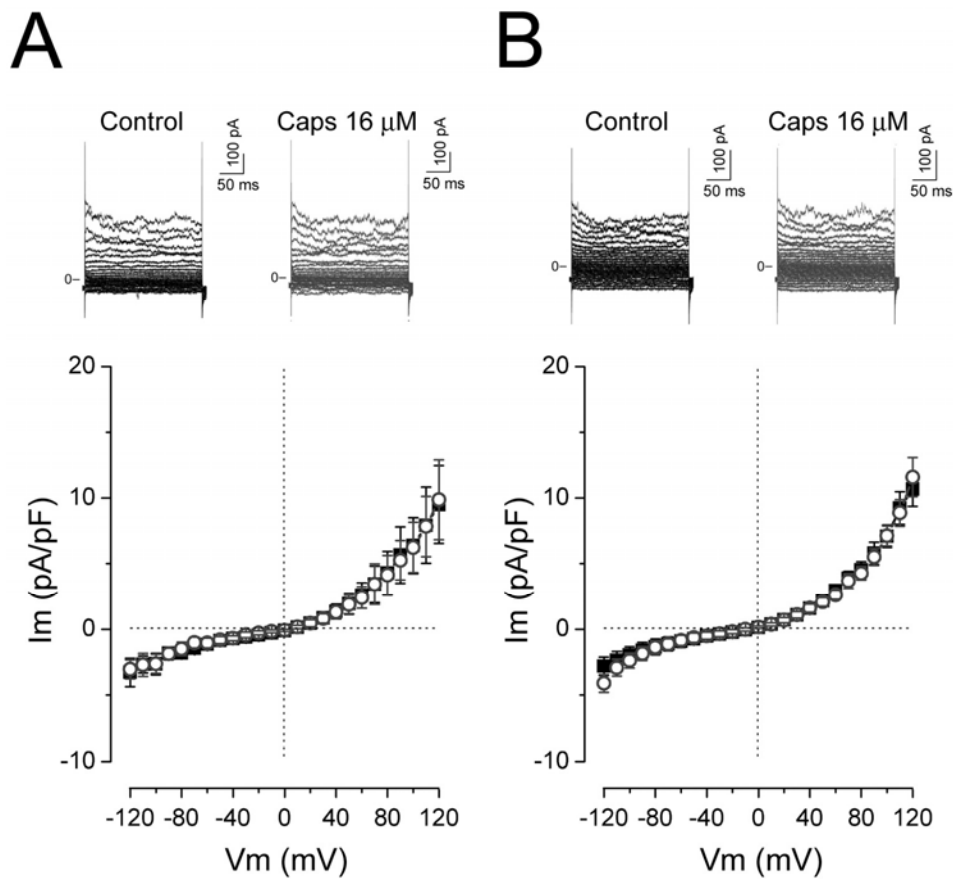




**Figura 17. El NGF no induce la expresión de corrientes catiónicas no selectivas sensibles a capsaicina en células beta de ratas neonatas. (A)** Los paneles superiores muestran los trazos de corriente representativos de células beta neonatas antes (Control) y después de la aplicación de capsaicina (Caps 16  $\mu$ M). Los paneles inferiores muestran las relaciones corriente a voltaje en condiciones Control (cuadrados sombreados) y en Caps 16  $\mu$ M (círculos), de una población de células beta de ratas neonatas (N=5). **(B)** Relaciones corriente a voltaje de células beta de ratas neonatas tratadas con NGF (50 ng/ml) durante 48 h (N=4). **(C)** Células tratadas con NGF antes y después de la aplicación de 0.4% de etanol, que fue el vehículo de solubilización de la capsaicina (N=3).

## **El canal TRPV1 no es funcional en la línea celular RINm5F**

La presencia de canales TRPV1 funcionales en el insulinoma de rata RINm5F ha sido propuesta tras evidencias farmacológicas indirectas de su actividad a través de ensayos de secreción de inulina (Akiba et al., 2004). Esta línea celular presenta varias similitudes importantes con los cultivos primarios de células beta de rata. Por ejemplo, la expresión de receptores a NGF, los cuales promueven el crecimiento de estructuras similares a neuritas (Polak et al., 1993; Vidaltamayo et al., 1996). Sin embargo, bajo las condiciones experimentales de este trabajo, no se pudieron detectar corrientes activadas por capsaicina en células controles o tratadas con NGF durante 48 h, cultivadas en medio RPMI 1640 suplementado con 1% de suero fetal bovino (**Figura 18**).



**Figura 18. La capsaicina no activa las corrientes catiónicas no selectivas en las células RINm5F controles o tratadas con NGF. (A)** Los paneles superiores muestran los trazos representativos de una célula RINm5F antes (Control) y después de la aplicación de capsaicina (Caps 16  $\mu$ M). El panel inferior muestra las relaciones IV de una población de células RINm5F (N=3) en condiciones control (cuadrados sombreados) y tras el tratamiento con capsaicina (círculos). **(B)** Representaciones similares al inciso (A) para las células RINm5F tratadas con NGF (50 ng/ml) durante 48 h (N=5).

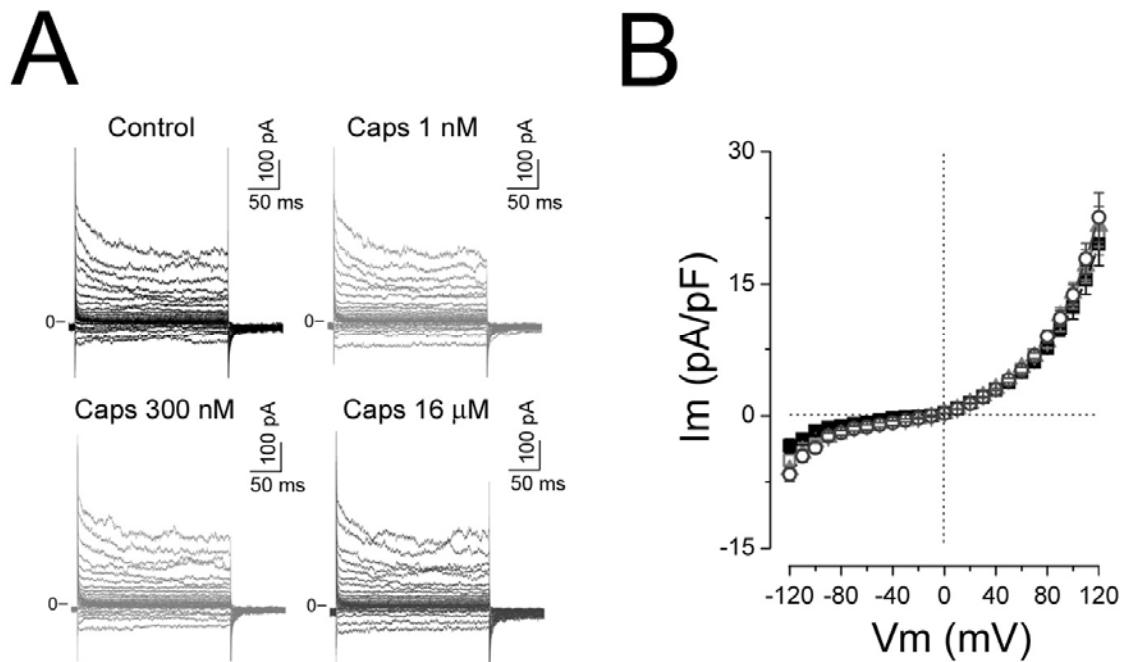
En otros estudios se ha sugerido que la capsaicina induce una potenciación de la secreción de insulina en células RINm5F con una relación dosis-respuesta en forma de campana, cuyo máximo se encuentra en 1 nM (Akiba et al., 2004). A fin de realizar un experimento comparable con este, se tomaron células cultivadas con 10% de suero bovino fetal y se expusieron a 1 nM, 300 nM y 16  $\mu$ M de capsaicina. Nuevamente no se observaron diferencias entre las corrientes obtenidas antes y después de la aplicación de capsaicina, lo cual resultó en la superposición de las relaciones IV en ambas condiciones (**Figura 19**). De tal manera, nuestros experimentos sugieren que los canales TRPV1 tampoco son funcionales en la línea celular RINm5F.

### **La ausencia del canal TRPV1 no afecta la secreción de insulina estimulada por glucosa**

Debido que no se obtuvo ninguna evidencia que apoyara la presencia del canal TRPV1 en las células beta pancreáticas, se procedió a explorar su posible función en el proceso de secreción de insulina estimulada por glucosa. Para examinar esta posibilidad se empleó el RHPA para comparar la secreción de insulina en células aisladas de ratones WT y *Trpv1*<sup>-/-</sup>. En este ensayo se midieron las áreas de inmunoplaca promedio (AIP) y la fracción de células secretoras (F). Se probaron cuatro condiciones experimentales: la incubación con 5.6 mM o 15.6 mM de

glucosa, (que asemejan las concentraciones basal y estimulantes del secretagogo); la estimulación con 40 mM KCl (la cual despolariza la membrana y activa directamente los canales sensibles a voltaje), así como la aplicación de NGF (50 ng/ml) en medio con 5.6 mM de glucosa (para sensibilizar los canales TRPV1 en caso de estar presentes).

De manera similar a lo que se ha descrito previamente en células beta murinas (Hiriart and Ramirez-Medeles, 1991; Rosenbaum et al., 2001), se observó que las células provenientes de ratones con fenotipo silvestre aumentaron sus AIP y sus F tras ser estimuladas con alta glucosa, KCl y NGF. Como era de esperarse a partir de las evidencias mencionadas anteriormente, las células beta de los ratones *Trpv1*<sup>-/-</sup> respondieron de manera similar a las WT tanto en la condición de glucosa basal, como en el resto de las condiciones estimulantes (**Tabla 3**). Interesantemente, el NGF causó un efecto pronunciado en el porcentaje de células secretoras en ambos grupos (de 1.3 y 1.5 veces para WT y *Trpv1*<sup>-/-</sup>, respectivamente), mientras que en las AIP causó un incremento significativo también, aunque menos acentuado que el efecto descrito en ratas (Rosenbaum et al., 2001; Vidaltamayo et al., 2002).



**Figura 19.** Las corrientes catiónicas no selectivas en las células RINm5F, cultivadas en medio con suero al 10%, no son sensibles a capsaicina. **(A)** Trazos de corriente representativos de una célula RINm5F antes (Control) y después de la aplicación de 1 nM, 300 nM y 16 μM de capsaicina (Caps). **(B)** Relaciones IV de células RINm5F (N=6) cultivadas en medio RPMI suplementado con suero bovino fetal al 10%, en condiciones Control (cuadrados sombreados en negro), y tratadas con Caps 1 nM (cuadrados grises), Caps 300 nM (triángulos grises) y Caps 16 μM (círculos grises). Entre las diferentes condiciones no hubo diferencias significativas.

**Tabla 3. La secreción de insulina medida por RHPA no está afectada en los ratones *Trpv1*<sup>-/-</sup>.** Las áreas de inmunoplaqueta de cada réplica se normalizaron por el valor promedio de la condición de 5.6 mM glucosa en cada experimento. Tanto el área de inmunoplaqueta promedio como el porcentaje de células secretoras fueron similares en ambos grupos experimentales, en todas las condiciones. Las letras diferentes denotan una  $p < 0.05$  en las comparaciones respecto a los índices medidos en glucosa basal.

	Área de inmunoplaqueta normalizada		Fracción de células secretoras (%)	
	WT	<i>Trpv1</i> <sup>-/-</sup>	WT	<i>Trpv1</i> <sup>-/-</sup>
<b>5.6G</b>	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.05	38 ± 2	33 ± 2
<b>15.6G</b>	1.38 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.43 ± 0.07 <sup>b</sup>	58 ± 2 <sup>a</sup>	55 ± 4 <sup>b</sup>
<b>5.6G+40KCl</b>	1.54 ± 0.16 <sup>a</sup>	1.52 ± 0.24 <sup>b</sup>	59 ± 1 <sup>a</sup>	59 ± 3 <sup>b</sup>
<b>5.6G+NGF</b>	1.13 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.16 ± 0.03 <sup>b</sup>	49 ± 2 <sup>a</sup>	51 ± 2 <sup>b</sup>

**a** denota una diferencia estadística de  $p < 0.05$  entre los tratamientos de las células de ratones WT. **b** denota una diferencia estadística de  $p < 0.05$  entre los tratamientos de las células de ratones *Trpv1*<sup>-/-</sup>. No se observaron diferencias entre las células de los animales WT y *Trpv1*<sup>-/-</sup> bajo las mismas condiciones.

El incremento en la secreción global de insulina se debe no sólo a la cantidad promedio de hormona que secreta una célula beta, sino al reclutamiento de una subpoblación silente de células beta en la condición basal de glucosa. Como una medida integradora de ambas contribuciones se calculó el índice de secreción. Los

resultados muestran que las células beta de los ratones WT y *Trpv1*<sup>-/-</sup> presentan un índice de secreción similar en condiciones basales de glucosa, y que de igual manera, aumenta en más del doble de su valor basal ante 15.6 mM de glucosa y 40 mM KCl, y aproximadamente en un 50% en presencia de NGF (**Figura 20**). Estos resultados indican que la ausencia de TRPV1 no afecta la secreción de insulina estimulada por glucosa o por despolarización con KCl. Además la capacidad del NGF de sensibilizar las células beta y potenciar la secreción de insulina fue similar en ambos grupos, lo que indica que tanto los mecanismos reguladores y las maquinarias metabólica, iónica y excitotónica de las células beta permanecen inalteradas aún cuando el canal TRPV1 está ausente.

### **Los ratones *Trpv1*<sup>-/-</sup> presentan una mayor sensibilidad a la insulina respecto a los ratones WT**

Los datos anteriores apoyan la noción de que el canal TRPV1 no participa en la secreción de insulina. Sin embargo, algunas evidencias experimentales apuntan a un posible papel del canal TRPV1 en la homeostasis de la glucosa. El peso corporal promedio y la talla de los ratones *Trpv1*<sup>-/-</sup>, por ejemplo, se redujeron en más de un 18% y un 5% respectivamente, cuando se compararon con los ratones WT (**Figura 21A,B**). Los ratones *Trpv1*<sup>-/-</sup> también mostraron una tendencia a presentar un menor índice de masa corporal, aunque no se observaron diferencias estadísticas en este

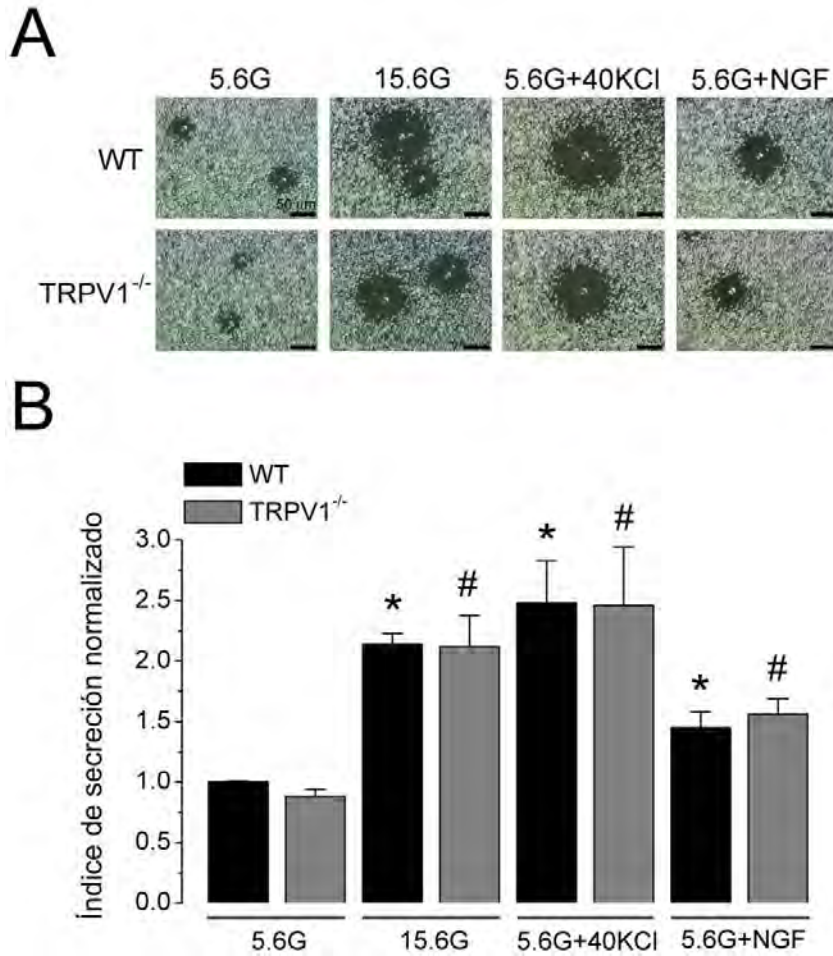


estudio (**Figura 21C**). Sin embargo, la circunferencia abdominal presentó una reducción modesta del 5%, aunque significativa, en los animales *Trpv1<sup>-/-</sup>* (**Figura 21D**).

De las comparaciones anteriores se podían suponer ciertas diferencias metabólicas en los ratones *Trpv1<sup>-/-</sup>* con respecto a los WT. Las mediciones de insulina en plasma de ratones en ayunas demostró que los animales *Trpv1<sup>-/-</sup>* presentan una reducción de 3.3 veces en los niveles circulantes de insulina con respecto a los de fenotipo silvestre (**Figura 22A**). A pesar de esto, e inesperadamente, las curvas de tolerancia a la glucosa de los ratones *Trpv1<sup>-/-</sup>* y WT resultaron ser muy similares (**Figura 22B**).

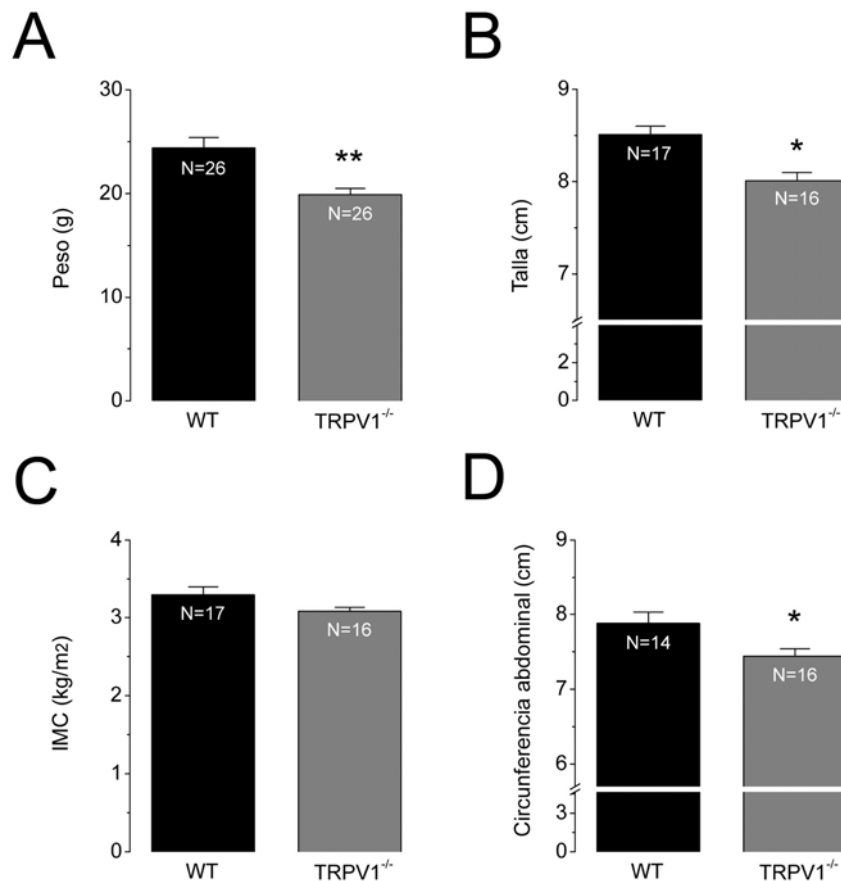
Los niveles de glucosa en ayunas de los animales fue similar entre ambos grupos y se incrementaron en la misma proporción tras un reto intraperitoneal de glucosa de 2 g/kg. En estos experimentos, los niveles de glucosa alcanzaron un máximo a los 15 min y los niveles basales se recuperaron 3 horas después de la inoculación. Tanto el nivel pico de glucosa como la caída hasta el nivel basal nuevamente, reflejan el balance entre la secreción de insulina y la incorporación de glucosa a los tejidos periféricos en respuesta a la insulina liberada. Sería de esperar que una reducción en la insulina circulante pudiera inducir hiperglucemia e intolerancia a la glucosa en los animales. Sin embargo, los ratones *Trpv1<sup>-/-</sup>* mostraron una tolerancia normal a la glucosa, lo cual podría ser explicado mediante una mayor respuesta a la acción de la insulina.

Con el fin de dilucidar esto, se realizó una prueba de tolerancia a la insulina, donde se inyectó una dosis de insulina de 0.2 U/kg a los ratones. En esta prueba se observó que en ambos grupos de animales los niveles de glucosa descendieron hasta una meseta de aproximadamente un 40% del valor inicial entre los 60-90 min. Tras esto, los niveles de glucosa aumentaron aunque a diferentes tasas de recuperación, por lo que a los 180 min, los ratones WT exhibieron un valor del 79% respecto al basal, mientras que los animales *Trpv1*<sup>-/-</sup> mostraron una reducción del 15% respecto a estos (**Figura 22C**).



**Figura 20. La secreción de insulina no difiere entre las células beta aisladas de ratones WT y *Trpv1*<sup>-/-</sup>.** (A) Micrografías representativas de los ensayos hemolíticos inversos tras la incubación durante una hora con 5.6 y 15.6 mM de glucosa (5.6G y 15.6G, respectivamente), con 5.6 mM más 40 mM KCl (5.6G+40KCl) o 50 ng/ml NGF (5.6G+NGF), en presencia de un anticuerpo contra insulina y sistema de complemento. La secreción de insulina es proporcional al área de inmunoplaaca. Barra de escala 50 µm. (B) Las células beta aisladas de ratones WT y *Trpv1*<sup>-/-</sup> no difieren en su secreción basal (5.6G) y muestran un incremento similar en el índice de secreción cuando se estimulan con alta glucosa, alto KCl y el tratamiento agudo con NGF. Las barras representan los índices de

secreción normalizados, como promedio  $\pm$  SEM de 3 experimentos diferentes por duplicado, excepto los experimentos con NGF (2 cultivos diferentes por duplicado) donde al menos 50 células se midieron por cámara. \*  $p < 0.05$  y #  $p < 0.05$  para las comparaciones entre la secreción de insulina de ratones WT y *Trpv1*<sup>-/-</sup>, respectivamente.



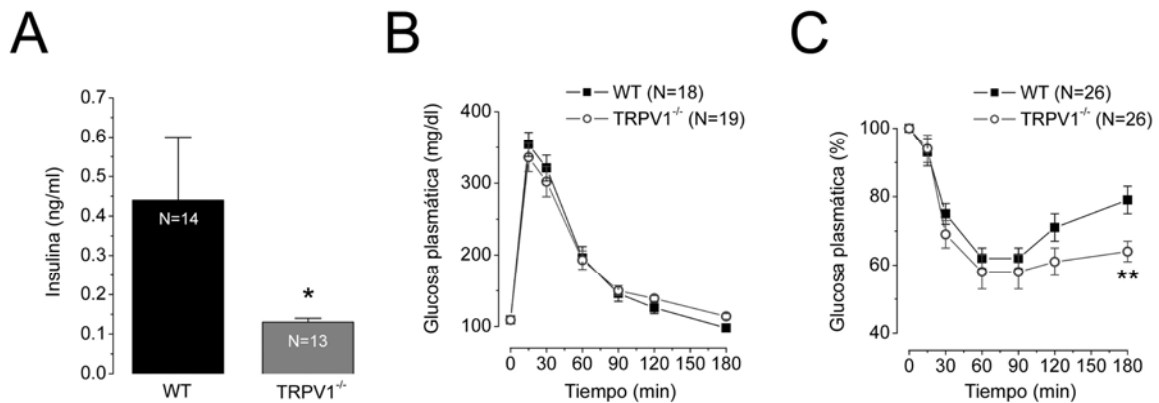
**Figura 21. Comparaciones morfométricas entre los ratones WT y *Trpv1*<sup>-/-</sup>.** (A) Los ratones *Trpv1*<sup>-/-</sup> presentan un peso corporal menor a los animales WT. (B) Los ratones *Trpv1*<sup>-/-</sup> también presentan tallas más pequeñas y aunque no se apreciaron diferencias en el índice de masa corporal (IMC) (C), la circunferencia abdominal de los ratones *Trpv1*<sup>-/-</sup> sí resultó menor que la de los animales WT.

## **La sensibilidad a la insulina de los ratones *Trpv1*<sup>-/-</sup> no se potencia por el bloqueo de los receptores beta adrenérgicos**

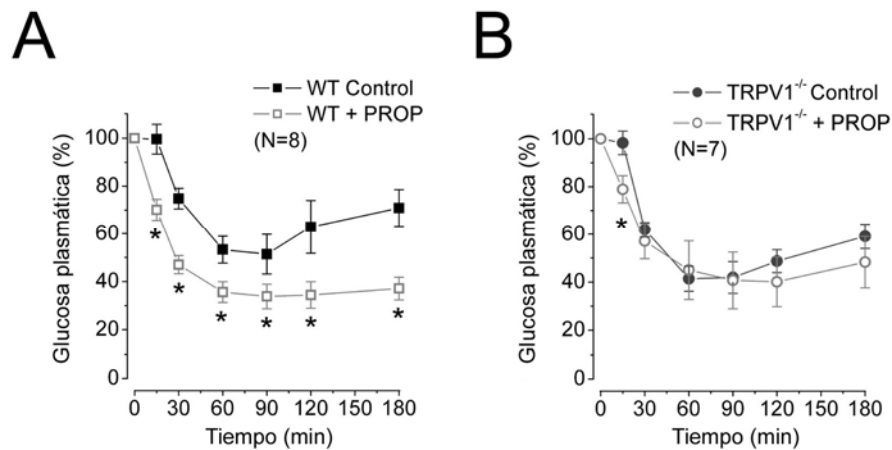
El propranolol, un bloqueador de los receptores beta adrenérgicos, se utilizó para determinar si el tono simpático pudiera contribuir a las diferencias en cuanto a la sensibilidad a la insulina entre los ratones WT y *Trpv1*<sup>-/-</sup>. A los animales se les realizó una prueba de tolerancia a la insulina y se dejaron durante 2 días en recuperación. Posteriormente, se les inyectó una dosis de propranolol de 5 mg/kg y se dejaron en ayunas durante 12 horas. Al término del ayuno se realizó una segunda prueba de tolerancia a la insulina, donde conjuntamente con esta hormona se repitió la misma dosis de propranolol. El tratamiento con propranolol causó un incremento en los niveles de glucosa en sangre de los animales en ayunas, de  $103 \pm 8$  mg/dl a  $165 \pm 9$  mg/dl en ratones WT ( $p < 0.01$ , N=8) y de  $119 \pm 12$  mg/dl a  $176 \pm 12$  mg/dl en animales *Trpv1*<sup>-/-</sup> ( $p < 0.01$ , N=7).

Para la comparación entre los animales control y tratados en ambos grupos, todas las mediciones fueron normalizadas respecto al valor de glucosa inicial previo a las pruebas de tolerancia a la insulina. De esta manera, los cambios tras la administración de insulina se expresan como porcentajes relativos al valor de glucosa al tiempo cero. Las curvas de tolerancia a la insulina antes y después del tratamiento con propranolol fueron estadísticamente diferentes en los ratones WT, pues el tratamiento con propranolol causó una reducción de los niveles de glucosa

respecto al grupo control en todos los tiempos analizados. A los 180 min, los niveles de glucosa de los ratones WT disminuyeron en alrededor de un 30% respecto a la condición control (**Figura 23A**). Por el contrario, el efecto del propranolol en los ratones *Trpv1*<sup>-/-</sup> fue prácticamente nulo, donde sólo se observaron diferencias significativas a los 15 min, mientras que el resto de las mediciones fueron similares entre sí (**Figura 23B**).



**Figura 22.** Los ratones *Trpv1*<sup>-/-</sup> presentan un menor nivel de insulina y una mayor sensibilidad a la insulina respecto a los animales WT. **(A)** Los niveles de insulina en ayunas estuvieron disminuidos en los ratones *Trpv1*<sup>-/-</sup> respecto a los ratones WT. **(B)** Los ratones WT y *Trpv1*<sup>-/-</sup> mostraron curvas de tolerancia a la glucosa similares. **(C)** La insulina administrada intraperitonealmente causó un mayor efecto en la reducción de los niveles de glucosa en los ratones *Trpv1*<sup>-/-</sup>, lo que indica una mayor sensibilidad en estos respecto a los WT. \*  $p < 0.05$  y \*\*  $p < 0.01$  para las comparaciones entre los grupos.



**Figura 23. La ausencia del canal TRPV1 previene el incremento de la sensibilidad a la insulina tras el bloqueo de los receptores beta adrenérgicos. (A)** Los niveles de glucosa se redujeron significativamente, lo que indica un aumento en la sensibilidad a la insulina. **(B)** El tratamiento con propranolol causó una disminución en los niveles de glucosa sólo a los 15 min en los ratones *Trpv1*<sup>-/-</sup> pero el resto de los puntos fueron indistinguibles estadísticamente, lo que sugiere que el tono beta adrenérgico en estos animales está disminuido. \*  $p < 0.05$  para las comparaciones entre los grupos control y tratados con propranolol.

## DISCUSIÓN

Desde el año 2004, varios estudios han sugerido que el canal TRPV1 pudiera ser relevante para la secreción de insulina en las células beta (Akiba et al., 2004; Waluk et al., 2012; Yang et al., 2011). Sin embargo, la información sobre el papel del canal TRPV1 en la secreción de insulina es controversial (Jabin Fagelskiold et al., 2012). En un intento de dilucidar el papel del canal TRPV1 en la secreción de insulina, se combinaron varias técnicas para determinar si el TRPV1 pudiera regular la secreción de insulina. A partir de los experimentos electrofisiológicos y de imagenología de  $\text{Ca}^{2+}$ , se determinó que el canal TRPV1 no se expresa funcionalmente ni en los cultivos primarios de células beta pancreáticas ni en la línea celular de insulinoma RINm5F. Estos resultados coinciden con estudios previos en cultivos primarios de células beta de rata y humanos, donde no se observó activación del canal TRPV1 en registros de patch clamp y microfluorimetría de  $\text{Ca}^{2+}$  (Jabin Fagelskiold et al., 2012). Sin embargo, otros grupos han propuesto que el canal TRPV1 es funcional en RINm5F, en contraste con los resultados de este trabajo.

Se ha propuesto que la capsaicina aumenta la secreción de insulina en función de la dosis en las células RINm5F con un efecto máximo a 1 nM, pero que se reduce en el intervalo de 10 nM a 1  $\mu\text{M}$  (Akiba et al., 2004). Akiba et al., reportaron que el efecto más notable de la capsaicina en células RINm5F ocurre a una concentración de 1 nM, la cual está lejos de la  $\text{EC}_{50}$  descrita para el canal TRPV1 ( $\approx 300$  nM)



(Nieto-Posadas et al., 2011). En ese estudio, los efectos de la capsaicina no fueron analizados en registros electrofisiológicos de las corrientes a través del canal TRPV1, pero además, no se pueden descartar interferencias en las aproximaciones farmacológicas que emplearon (por ejemplo, la capsazepina puede modular otros canales presentes en las células beta como los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  activados por voltaje (Castillo et al., 2007; Docherty et al., 1997)). De hecho, otros autores han propuesto un efecto de la capsaicina a bajas concentraciones (0.1 a 1 nM) en la rigidez de las membranas de esta misma línea celular (Yang et al., 2011).

Para corroborar si el canal TRPV1 resulta irrelevante a la secreción de insulina, los ratones *Trpv1*<sup>-/-</sup> se utilizaron como un modelo de eliminación genética de este canal. De acuerdo con las evidencias obtenidas, la ausencia del canal TRPV1 no afecta ni a la secreción basal ni a la estimulada por alta glucosa, indicando que el canal TRPV1 no desempeña un papel determinante en la respuesta a la glucosa de las células beta pancreáticas. Al parecer resulta poco probable que el canal TRPV1 participe en la secreción de insulina, pues su ausencia no afecta este proceso ni causa una intolerancia evidente a la glucosa, como sucede con otros canales TRP presentes en la célula beta, como son los canales TRPM2 y TRPM5 (Coolsoul et al., 2010; Uchida et al., 2011).

Interesantemente, los ratones *Trpv1*<sup>-/-</sup> muestran una liberación de insulina normal en respuesta a la despolarización inducida por KCl y la exposición a NGF. De esta

manera, la ablación genética del canal TRPV1 tampoco fue responsable de modificaciones en la función de los canales sensibles a voltaje ni causó alteraciones de la exocitosis de insulina. Estos resultados sugieren que los canales TRPV1 no interactúan con las proteínas sinápticas ni afectan el tráfico vesicular de las células beta, lo que pudiera suceder en caso de que el canal TRPV1 participara en la exocitosis regulada y el reciclaje vesicular de forma similar a como ocurre en las neuronas (Goswami et al., 2010; Morenilla-Palao et al., 2004).

Sin embargo, las diferencias de peso y circunferencia abdominal entre los ratones WT y *Trpv1*<sup>-/-</sup> sugerían diferencias importantes en la homeostasis de la glucosa entre estos animales. En efecto, los ratones *Trpv1*<sup>-/-</sup> mostraron menores niveles de insulina en ayunas pero sus curvas de tolerancia a la glucosa fueron similares a las de los ratones WT. El motivo por el cual seleccionamos una vía de administración intraperitoneal para la glucosa se debió a que se conoce que los ratones *Trpv1*<sup>-/-</sup> presentan una tolerancia oral a la glucosa alterada debido al papel regulador del canal TRPV1 sobre la secreción de GLP-1 (Wang et al., 2012), lo cual podría causar interpretaciones incorrectas de los datos. Por tanto, la administración intraperitoneal de glucosa evitó las posibles diferencias entre los ratones WT y *Trpv1*<sup>-/-</sup> en cuanto a procesos absortivos en los intestinos, la secreción de incretinas y sus efectos sobre la secreción de insulina.

La aparente contradicción entre los niveles de glucosa disminuidos en los ratones *Trpv1<sup>-/-</sup>* y las curvas de tolerancia normales a la glucosa se resolvió tras las pruebas de tolerancia a la insulina. Se pudo apreciar que los ratones *Trpv1<sup>-/-</sup>* mostraron una mayor sensibilidad a la insulina con respecto a los WT, lo que pudiera compensar los niveles disminuidos de insulina en estos animales. Estos resultados sobre la sensibilidad a la insulina coinciden con lo descrito por Razavi y colegas (Razavi et al., 2006), sin embargo, contrastan con los suyos en cuanto a que ellos observan una mejor tolerancia a la glucosa en los ratones *Trpv1<sup>-/-</sup>*. No obstante, existen varias diferencias entre nuestros estudios que pudieran dar lugar a este desacuerdo.

En el estudio de Razavi et al. se empleó un tamaño muestral pequeño y ratones de menor edad (5 animales de 6-8 semanas por grupo, contra 18-19 animales de 8-10 semanas de edad en el presente trabajo). Sus ratones presentaron además mayores valores iniciales en la curva de tolerancia a la glucosa ( $\approx 10$  mM o 180 mg/dl), lo cual sugiere que el proceso de ayuno no fue similar al de este estudio, donde el nivel promedio de glucosa basal en las pruebas de tolerancia a la glucosa fue de 109 mg/dl. Por otra parte, los resultados obtenidos en el presente estudio coinciden con los de Marshall et al., quienes observaron una tolerancia a la glucosa similar entre los ratones WT y *Trpv1<sup>-/-</sup>*, a pesar de que estos últimos presentaron una disminución en la resistencia a la insulina.

El hecho de que la ausencia del canal TRPV1 aumente la sensibilidad de insulina pudiera tener implicaciones en la terapéutica de las enfermedades metabólicas. Por ejemplo, se conoce que la administración de un antagonista del canal TRPV1 en ratones *ob/ob*, un modelo de diabetes mellitus tipo 2 (DM2), disminuye la hiperglucemia y la resistencia a la insulina en estos, lo que resulta en una mejor tolerancia a la glucosa (Tanaka et al., 2011). Además, la eliminación de las fibras sensibles a capsaicina en las ratas obesas Zucker, otro modelo de DM2, mejora la tolerancia a la glucosa y reduce los niveles de hemoglobina glucosilada, lo que indica una menor resistencia a la insulina (Gram et al., 2007). A esto se suma que los ratones *Trpv1<sup>-/-</sup>* son resistentes al síndrome metabólico inducido por una dieta alta en grasas, y aunque su ganancia de peso es similar a los WT, muestran menores niveles de citocinas proinflamatorias, presión sanguínea sistólica e intolerancia a la glucosa (Marshall et al., 2012).

La inervación del islote por las fibras sensoriales positivas a TRPV1 regula la secreción de insulina y la inflamación (Razavi et al., 2006); sin embargo, se desconocen los mecanismos que contribuyen al efecto sensibilizador a la insulina derivados de la ausencia del canal TRPV1. Además, las fibras sensoriales que inervan la circulación portal y regulan la respuesta simpatoadrenal ante la hipoglucemia, se afectan tras la denervación mediada por capsaicina. Interesantemente, se ha demostrado que el tratamiento con capsaicina, causante de

la eliminación selectiva de las fibras sensoriales positivas a TRPV1, induce menores incrementos en los niveles de adrenalina y noradrenalina en situaciones de hipoglucemia con respecto a los animales controles (Fujita et al., 2007). Por otro lado, los receptores beta adrenérgicos se expresan tanto en las células beta pancreáticas como en los tejidos sensibles a la insulina y su eliminación genética causa un incremento de la sensibilidad a la insulina y una disminución de la liberación de insulina estimulada por glucosa (Asensio et al., 2005).

Por todo lo anterior, se puso a prueba si el tono adrenérgico reducido en los ratones *Trpv1*<sup>-/-</sup> pudiera ser el responsable, al menos en parte, del incremento en la sensibilidad a la insulina. Para demostrar esto se utilizó el propranolol como un bloqueador de los receptores beta adrenérgicos y se analizaron sus efectos en pruebas de tolerancia a la insulina. Se conoce, por ejemplo, que este fármaco disminuye los efectos de las catecolaminas en la musculatura esquelética de ratas diabéticas (Bostrom et al., 1989).

En el presente estudio, la administración de propranolol causó una elevación de los niveles de glucosa plasmática en los animales en ayunas, lo cual pudiera deberse al bloqueo de los receptores beta-2 adrenérgicos en las células beta. No obstante el efecto más notable fue que el propranolol redujo significativamente los niveles de glucosa en las curvas de tolerancia a la insulina en los ratones WT, pero no en los

animales *Trpv1<sup>-/-</sup>*, lo que significa que en estos últimos el bloqueo beta adrenérgico no causa un aumento en la sensibilidad a la insulina.

Este mecanismo compensatorio que combina una reducción de la secreción de insulina y también de la resistencia periférica a esta, no es exclusivo de los ratones *Trpv1<sup>-/-</sup>*, pues los animales *Trpm2<sup>-/-</sup>* también presentan un fenotipo similar, el cual previene el deterioro de su estado metabólico ante una dieta alta en grasas (Zhang et al., 2012). Los islotes pancreáticos de los ratones que carecen del canal TRPM8, el cual también se expresa en fibras periféricas sensoriales, muestran una secreción de insulina normal en respuesta a la glucosa o el KCl. No obstante, los animales en ayunas muestran unos niveles de insulina menores que los ratones WT, lo cual se ha asociado con un mayor aclaramiento de la insulina en los primeros (McCoy et al., 2013). Interesantemente, los animales *Trpm8<sup>-/-</sup>* presentan curvas de tolerancia a la glucosa normales, quizás por una compensación de sus menores niveles de insulina con una mayor sensibilidad a esta en los tejidos periféricos (McCoy et al., 2013), de manera similar a los resultados que aquí se presentan para los ratones *Trpv1<sup>-/-</sup>*.

## CONCLUSIONES

El presente estudio demuestra que el canal TRPV1 no es funcional en las células beta pancreáticas y evidencia la participación de este en la regulación de la sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos mediante la interacción del canal TRPV1 y el tono adrenérgico. De acuerdo a los resultados obtenidos, se propone que aunque el canal TRPV1 no participa intrínsecamente en la fisiología de las células beta pancreáticas, pudiera ser relevante para comprender algunas de las complicaciones características de la diabetes mellitus, sobre todo relacionadas con las neuropatías autonómicas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aguayo-Mazzucato, C., Sanchez-Soto, C., Godinez-Puig, V., Gutierrez-Ospina, G., Hiriart, M., 2006. Restructuring of pancreatic islets and insulin secretion in a postnatal critical window. *PLoS One* 1, e35.
- Aicardi, G., Pollo, A., Sher, E., Carbone, E., 1991. Noradrenergic inhibition and voltage-dependent facilitation of omega-conotoxin-sensitive Ca channels in insulin-secreting RINm5F cells. *FEBS Lett* 281, 201-204.
- Akiba, Y., Kato, S., Katsube, K., Nakamura, M., Takeuchi, K., Ishii, H., Hibi, T., 2004. Transient receptor potential vanilloid subfamily 1 expressed in pancreatic islet beta cells modulates insulin secretion in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 321, 219-225.
- Alvarez, C., Mancheno, J.M., Martinez, D., Tejuca, M., Pazos, F., Lanio, M.E., 2009. Sticholysins, two pore-forming toxins produced by the Caribbean Sea anemone *Stichodactyla helianthus*: their interaction with membranes. *Toxicon* 54, 1135-1147.
- Andreev, Y.A., Kozlov, S.A., Koshelev, S.G., Ivanova, E.A., Monastyrnaya, M.M., Kozlovskaya, E.P., Grishin, E.V., 2008. Analgesic compound from sea anemone *Heteractis crispa* is the first polypeptide inhibitor of vanilloid receptor 1 (TRPV1). *J Biol Chem* 283, 23914-23921.
- Aoyagi, K., Ohara-Imaizumi, M., Nishiwaki, C., Nakamichi, Y., Nagamatsu, S., 2010. Insulin/phosphoinositide 3-kinase pathway accelerates the glucose-induced first-phase insulin secretion through TrpV2 recruitment in pancreatic beta-cells. *Biochem J* 432, 375-386.
- Asensio, C., Jimenez, M., Kuhne, F., Rohner-Jeanrenaud, F., Muzzin, P., 2005. The lack of beta-adrenoceptors results in enhanced insulin sensitivity in mice exhibiting increased adiposity and glucose intolerance. *Diabetes* 54, 3490-3495.
- Ashcroft, F.M., Rorsman, P., 1989. Electrophysiology of the pancreatic beta-cell. *Prog Biophys Mol Biol* 54, 87-143.
- Barquera, S., Campos-Nonato, I., Aguilar-Salinas, C., Lopez-Ridaura, R., Arredondo, A., Rivera-Dommarco, J., 2013. Diabetes in Mexico: cost and management of diabetes and its complications and challenges for health policy. *Global Health* 9, 3.
- Barrett, E.J., 2012. *Medical Physiology. A Cellular and Molecular Approach*, Second ed. Saunders Elsevier, Philadelphia, PA, USA.
- Bostrom, M., Nie, Z., Goertz, G., Henriksson, J., Wallberg-Henriksson, H., 1989. Indirect effect of catecholamines on development of insulin resistance in skeletal muscle from diabetic rats. *Diabetes* 38, 906-910.
- Bouchard, C., Price, R.B., Moneypenny, C.G., Thompson, L.F., Zillhardt, M., Stalheim, L., Anderson, P.A., 2006. Cloning and functional expression of voltage-



gated ion channel subunits from cnidocytes of the Portuguese Man O'War *Physalia physalis*. *J Exp Biol* 209, 2979-2989.

Braun, M., Ramracheya, R., Bengtsson, M., Zhang, Q., Karanauskaite, J., Partridge, C., Johnson, P.R., Rorsman, P., 2008. Voltage-gated ion channels in human pancreatic beta-cells: electrophysiological characterization and role in insulin secretion. *Diabetes* 57, 1618-1628.

Brixel, L.R., Monteilh-Zoller, M.K., Ingenbrandt, C.S., Fleig, A., Penner, R., Enklaar, T., Zabel, B.U., Prawitt, D., 2010. TRPM5 regulates glucose-stimulated insulin secretion. *Pflugers Arch* 460, 69-76.

Brozinick, J.T., Hawkins, E., Hoang Bui, H., Kuo, M.S., Tan, B., Kievit, P., Grove, K., 2012. Plasma sphingolipids are biomarkers of metabolic syndrome in non-human primates maintained on a Western-style diet. *Int J Obes (Lond)*.

Burnett, J.W., Calton, G.J., 1986. Pharmacological effects of various venoms on cutaneous capillary leakage. *Toxicon* 24, 614-617.

Burnett, J.W., Ordonez, J.V., Calton, G.J., 1986. Differential toxicity of *Physalia physalis* (Portuguese man-o'war) nematocysts separated by flow cytometry. *Toxicon* 24, 514-518.

Cabrera-Vasquez, S., Navarro-Tableros, V., Sanchez-Soto, C., Gutierrez-Ospina, G., Hiriart, M., 2009. Remodelling sympathetic innervation in rat pancreatic islets ontogeny. *BMC Dev Biol* 9, 34.

Cao, D.S., Zhong, L., Hsieh, T.H., Abooj, M., Bishnoi, M., Hughes, L., Premkumar, L.S., 2012. Expression of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) and its role in insulin release from rat pancreatic beta cells. *PLoS One* 7, e38005.

Casas, S., Novials, A., Reimann, F., Gomis, R., Gribble, F.M., 2008. Calcium elevation in mouse pancreatic beta cells evoked by extracellular human islet amyloid polypeptide involves activation of the mechanosensitive ion channel TRPV4. *Diabetologia* 51, 2252-2262.

Castaneda, O., Harvey, A.L., 2009. Discovery and characterization of cnidarian peptide toxins that affect neuronal potassium ion channels. *Toxicon* 54, 1119-1124.

Castillo, E., Lopez-Gonzalez, I., De Regil-Hernandez, R., Reyes-Duarte, D., Sanchez-Herrera, D., Lopez-Munguia, A., Darszon, A., 2007. Enzymatic synthesis of capsaicin analogs and their effect on the T-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Biochem Biophys Res Commun* 356, 424-430.

Catterall, W.A., 2000. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 26, 13-25.

Catterall, W.A., Beress, L., 1978. Sea anemone toxin and scorpion toxin share a common receptor site associated with the action potential sodium ionophore. *J Biol Chem* 253, 7393-7396.

Catterall, W.A., Goldin, A.L., Waxman, S.G., 2005. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev* 57, 397-409.

- Cawthorn, E.G., Chan, C.B., 1991. Effect of pertussis toxin on islet insulin secretion in obese (fa/fa) Zucker rats. *Mol Cell Endocrinol* 75, 197-204.
- Cestele, S., Catterall, W.A., 2000. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie* 82, 883-892.
- Clapham, D.E., Montell, C., Schultz, G., Julius, D., 2003. International Union of Pharmacology. XLIII. Compendium of voltage-gated ion channels: transient receptor potential channels. *Pharmacol Rev* 55, 591-596.
- Cline, G.W., Zhao, X., Jakowski, A.B., Soeller, W.C., Treadway, J.L., 2011. Islet-selectivity of G-protein coupled receptor ligands evaluated for PET imaging of pancreatic beta-cell mass. *Biochem Biophys Res Commun* 412, 413-418.
- Colsoul, B., Schraenen, A., Lemaire, K., Quintens, R., Van Lommel, L., Segal, A., Owsianik, G., Talavera, K., Voets, T., Margolskee, R.F., Kokrashvili, Z., Gilon, P., Nilius, B., Schuit, F.C., Vennekens, R., 2010. Loss of high-frequency glucose-induced Ca<sup>2+</sup> oscillations in pancreatic islets correlates with impaired glucose tolerance in *Trpm5*<sup>-/-</sup> mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 5208-5213.
- Colsoul, B., Vennekens, R., Nilius, B., 2011. Transient receptor potential cation channels in pancreatic beta cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 161, 87-110.
- Cormier, S.M., 1984. Exocytotic and cytolytic release of histamine from mast cells treated with Portuguese man-of-war (*Physalia physalis*) venom. *J Exp Zool* 231, 1-10.
- Cromer, B.A., McIntyre, P., 2008. Painful toxins acting at TRPV1. *Toxicon* 51, 163-173.
- Cruz-Cruz, R., Salgado, A., Sanchez-Soto, C., Vaca, L., Hiriart, M., 2005. Thapsigargin-sensitive cationic current leads to membrane depolarization, calcium entry, and insulin secretion in rat pancreatic beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289, E439-445.
- Cuyppers, E., Yanagihara, A., Karlsson, E., Tytgat, J., 2006. Jellyfish and other cnidarian envenomations cause pain by affecting TRPV1 channels. *FEBS Lett* 580, 5728-5732.
- Chai, X.Y., Sun, J.F., Tang, L.Y., Yang, X.W., Li, Y.Q., Huang, H., Zhou, X.F., Yang, B., Liu, Y., 2010. A novel cyclopentene derivative and a polyhydroxylated steroid from a South China Sea gorgonian *Menella* sp. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 58, 1391-1394.
- Chen, B.W., Chao, C.H., Su, J.H., Wen, Z.H., Sung, P.J., Sheu, J.H., 2010. Anti-inflammatory eunicellin-based diterpenoids from the cultured soft coral *Klyxum simplex*. *Org Biomol Chem* 8, 2363-2366.
- Chen, Y.H., Tai, C.Y., Su, Y.D., Chang, Y.C., Lu, M.C., Weng, C.F., Su, J.H., Hwang, T.L., Wu, Y.C., Sung, P.J., 2011. Discovery of new eunicellins from an Indonesian octocoral *Cladiella* sp. *Mar Drugs* 9, 934-943.

Cheng, H., Beck, A., Launay, P., Gross, S.A., Stokes, A.J., Kinet, J.P., Fleig, A., Penner, R., 2007. TRPM4 controls insulin secretion in pancreatic beta-cells. *Cell Calcium* 41, 51-61.

Chi, V., Pennington, M.W., Norton, R.S., Tarcha, E.J., Londono, L.M., Sims-Fahey, B., Upadhyay, S.K., Lakey, J.T., Iadonato, S., Wulff, H., Beeton, C., Chandy, K.G., 2012. Development of a sea anemone toxin as an immunomodulator for therapy of autoimmune diseases. *Toxicon* 59, 529-546.

Diaz-Garcia, C.M., Fuentes-Silva, D., Sanchez-Soto, C., Dominguez-Perez, D., Garcia-Delgado, N., Varela, C., Mendoza-Hernandez, G., Rodriguez-Romero, A., Castaneda, O., Hiriart, M., 2012. Toxins from *Physalia physalis* (Cnidaria) raise the intracellular Ca(2+) of beta-cells and promote insulin secretion. *Curr Med Chem* 19, 5414-5423.

Diaz-Garcia, C.M., Sanchez-Soto, C., Hiriart, M., 2010. Toxins that modulate ionic channels as tools for exploring insulin secretion. *Cell Mol Neurobiol* 30, 1275-1281.

Diaz-Garcia, C.M., Sanchez-Soto, C., Hiriart, M., 2013. TRPM channels phosphorylation as a potential bridge between old signals and novel regulatory mechanisms of insulin secretion. *Curr Diabetes Rev.*

Diochot, S., Baron, A., Rash, L.D., Deval, E., Escoubas, P., Scarzello, S., Salinas, M., Lazdunski, M., 2004. A new sea anemone peptide, APETx2, inhibits ASIC3, a major acid-sensitive channel in sensory neurons. *EMBO J* 23, 1516-1525.

Docherty, R.J., Yeats, J.C., Piper, A.S., 1997. Capsazepine block of voltage-activated calcium channels in adult rat dorsal root ganglion neurones in culture. *Br J Pharmacol* 121, 1461-1467.

Dominguez-Perez, D., Diaz-Garcia, C.M., Garcia-Delgado, N., Sierra-Gomez, Y., Castaneda, O., Antunes, A., 2013. Insights into the Toxicological Properties of a Low Molecular Weight Fraction from *Zoanthus sociatus* (Cnidaria). *Mar Drugs* 11, 2873-2881.

Dufer, M., Haspel, D., Krippeit-Drews, P., Kelm, M., Ranta, F., Nitschke, R., Ullrich, S., Aguilar-Bryan, L., Bryan, J., Drews, G., 2007. The KATP channel is critical for calcium sequestration into non-ER compartments in mouse pancreatic beta cells. *Cell Physiol Biochem* 20, 65-74.

Dufer, M., Krippeit-Drews, P., Drews, G., 2002. Inhibition of mitochondrial function affects cellular Ca<sup>2+</sup> handling in pancreatic B-cells. *Pflugers Arch* 444, 236-243.

Dunn, C., 2009. Siphonophores. *Curr Biol* 19, R233-234.

Edwards, L., Luo, E., Hall, R., Gonzalez, R.R., Jr., Hessinger, D.A., 2000. The effect of Portuguese Man-of-war (*Physalia physalis*) venom on calcium, sodium and potassium fluxes of cultured embryonic chick heart cells. *Toxicon* 38, 323-335.

Ellis, J., 1767. An Account of the *Actinia Sociata*, or Clustered Animal-Flower, Lately Found on the Sea-Coasts of the New-Ceded Islands: In a Letter from John

Ellis, Esquire, F. R. S. to the Right Honourable the Earl of Hillsborough, F. R. S. *Phil. Trans.* **57**, 428-437.

Ernst, S.J., Aguilar-Bryan, L., Noebels, J.L., 2009. Sodium channel beta1 regulatory subunit deficiency reduces pancreatic islet glucose-stimulated insulin and glucagon secretion. *Endocrinology* **150**, 1132-1139.

Estrada, G., Villegas, E., Corzo, G., 2007. Spider venoms: a rich source of acylpolyamines and peptides as new leads for CNS drugs. *Nat Prod Rep* **24**, 145-161.

Fujita, S., Bohland, M., Sanchez-Watts, G., Watts, A.G., Donovan, C.M., 2007. Hypoglycemic detection at the portal vein is mediated by capsaicin-sensitive primary sensory neurons. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **293**, E96-E101.

Furman, B.L., 2012. The development of Byetta (exenatide) from the venom of the Gila monster as an anti-diabetic agent. *Toxicon* **59**, 464-471.

Gilon, P., Arredouani, A., Gailly, P., Gromada, J., Henquin, J.C., 1999. Uptake and release of Ca<sup>2+</sup> by the endoplasmic reticulum contribute to the oscillations of the cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration triggered by Ca<sup>2+</sup> influx in the electrically excitable pancreatic B-cell. *J Biol Chem* **274**, 20197-20205.

Gleibs, S., Mebs, D., Werding, B., 1995. Studies on the origin and distribution of palytoxin in a Caribbean coral reef. *Toxicon* **33**, 1531-1537.

Gómez, T., Romero, D.L., Wong, L., Barral, A.M., Martínez, J.R., Chávez, M.A., 1986. Isolation and partial purification of two toxins and a protease inhibitor from *Stoichactis helianthus* anemone. *Rev. Cubana Invest. Biom.* **5**, 117-125.

Goncalves, A.A., Toyama, M.H., Carneiro, E.M., Marangoni, S., Arantes, E.C., Giglio, J.R., Boschero, A.C., 2003. Participation of Na(+) channels in the potentiation by *Tityus serrulatus* alpha-toxin TsTx-V of glucose-induced electrical activity and insulin secretion in rodent islet beta-cells. *Toxicon* **41**, 1039-1045.

Gordon, D., Karbat, I., Ilan, N., Cohen, L., Kahn, R., Gilles, N., Dong, K., Stuhmer, W., Tytgat, J., Gurevitz, M., 2007. The differential preference of scorpion alpha-toxins for insect or mammalian sodium channels: implications for improved insect control. *Toxicon* **49**, 452-472.

Gordon, D., Zlotkin, E., 1993. Binding of an alpha scorpion toxin to insect sodium channels is not dependent on membrane potential. *FEBS Lett* **315**, 125-128.

Goswami, C., Rademacher, N., Smalla, K.H., Kalscheuer, V., Ropers, H.H., Gundelfinger, E.D., Hucho, T., 2010. TRPV1 acts as a synaptic protein and regulates vesicle recycling. *J Cell Sci* **123**, 2045-2057.

Graham, S., Yuan, J.P., Ma, R., 2012. Canonical transient receptor potential channels in diabetes. *Exp Biol Med (Maywood)* **237**, 111-118.

Gram, D.X., Ahren, B., Nagy, I., Olsen, U.B., Brand, C.L., Sundler, F., Tabanera, R., Svendsen, O., Carr, R.D., Santha, P., Wierup, N., Hansen, A.J., 2007. Capsaicin-sensitive sensory fibers in the islets of Langerhans contribute to defective insulin

secretion in Zucker diabetic rat, an animal model for some aspects of human type 2 diabetes. *Eur J Neurosci* 25, 213-223.

Grimm, C., Kraft, R., Schultz, G., Harteneck, C., 2005. Activation of the melastatin-related cation channel TRPM3 by D-erythro-sphingosine [corrected]. *Mol Pharmacol* 67, 798-805.

Haddad, V., Jr., da Silveira, F.L., Cardoso, J.L., Morandini, A.C., 2002. A report of 49 cases of cnidarian envenoming from southeastern Brazilian coastal waters. *Toxicon* 40, 1445-1450.

Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F.J., 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391, 85-100.

Hatlapatka, K., Willenborg, M., Rustenbeck, I., 2009. Plasma membrane depolarization as a determinant of the first phase of insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297, E315-322.

Henquin, J.C., Meissner, H.P., 1984. Significance of ionic fluxes and changes in membrane potential for stimulus-secretion coupling in pancreatic B-cells. *Experientia* 40, 1043-1052.

Herrington, J., 2007. Gating modifier peptides as probes of pancreatic beta-cell physiology. *Toxicon* 49, 231-238.

Herrington, J., Sanchez, M., Wunderler, D., Yan, L., Bugianesi, R.M., Dick, I.E., Clark, S.A., Brochu, R.M., Priest, B.T., Kohler, M.G., McManus, O.B., 2005. Biophysical and pharmacological properties of the voltage-gated potassium current of human pancreatic beta-cells. *J Physiol* 567, 159-175.

Herrington, J., Zhou, Y.P., Bugianesi, R.M., Dulski, P.M., Feng, Y., Warren, V.A., Smith, M.M., Kohler, M.G., Garsky, V.M., Sanchez, M., Wagner, M., Raphaelli, K., Banerjee, P., Ahaghotu, C., Wunderler, D., Priest, B.T., Mehl, J.T., Garcia, M.L., McManus, O.B., Kaczorowski, G.J., Slaughter, R.S., 2006. Blockers of the delayed-rectifier potassium current in pancreatic beta-cells enhance glucose-dependent insulin secretion. *Diabetes* 55, 1034-1042.

Hillaire-Buys, D., Gross, R., Roye, M., Ribes, G., Loubatieres-Mariani, M.M., 1992. Adrenergic inhibition of insulin secretion involves pertussis toxin-sensitive and -insensitive mechanisms. *Eur J Pharmacol* 218, 359-362.

Hiriart, M., Aguilar-Bryan, L., 2008. Channel regulation of glucose sensing in the pancreatic beta-cell. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295, E1298-1306.

Hiriart, M., Matteson, D.R., 1988. Na channels and two types of Ca channels in rat pancreatic B cells identified with the reverse hemolytic plaque assay. *J Gen Physiol* 91, 617-639.

Hiriart, M., Ramirez-Medeles, M.C., 1991. Functional subpopulations of individual pancreatic B-cells in culture. *Endocrinology* 128, 3193-3198.

- Hiriart, M., Vidaltamayo, R., Sanchez-Soto, M.C., 2001. Nerve and fibroblast growth factors as modulators of pancreatic beta cell plasticity and insulin secretion. *Isr Med Assoc J* 3, 114-116.
- Hisanaga, E., Nagasawa, M., Ueki, K., Kulkarni, R.N., Mori, M., Kojima, I., 2009. Regulation of calcium-permeable TRPV2 channel by insulin in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 58, 174-184.
- Holz, G.G., Habener, J.F., 1998. Black widow spider alpha-latrotoxin: a presynaptic neurotoxin that shares structural homology with the glucagon-like peptide-1 family of insulin secretagogic hormones. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 121, 177-184.
- Holz, G.G., Leech, C.A., Habener, J.F., 2000. Insulinotropic toxins as molecular probes for analysis of glucagon-like peptide-1 receptor-mediated signal transduction in pancreatic beta-cells. *Biochimie* 82, 915-926.
- Honma, T., Shiomi, K., 2006. Peptide toxins in sea anemones: structural and functional aspects. *Mar Biotechnol (NY)* 8, 1-10.
- Inagaki, N., Kuromi, H., Gono, T., Okamoto, Y., Ishida, H., Seino, Y., Kaneko, T., Iwanaga, T., Seino, S., 1995. Expression and role of ionotropic glutamate receptors in pancreatic islet cells. *FASEB J* 9, 686-691.
- Ishii, M., Shimizu, S., Hara, Y., Hagiwara, T., Miyazaki, A., Mori, Y., Kiuchi, Y., 2006. Intracellular-produced hydroxyl radical mediates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> influx and cell death in rat beta-cell line RIN-5F. *Cell Calcium* 39, 487-494.
- Islam, M.S., 2002. The ryanodine receptor calcium channel of beta-cells: molecular regulation and physiological significance. *Diabetes* 51, 1299-1309.
- Islam, M.S., 2011. TRP channels of islets. *Adv Exp Med Biol* 704, 811-830.
- Iwanir, S., Reuveny, E., 2008. Adrenaline-induced hyperpolarization of mouse pancreatic islet cells is mediated by G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels. *Pflugers Arch* 456, 1097-1108.
- Jabin Fagelskiold, A., Kannisto, K., Bostrom, A., Hadrovic, B., Farre, C., Eweida, M., Wester, K., Islam, M.S., 2012. Insulin-secreting INS-1E cells express functional TRPV1 channels. *Islets* 4.
- Jara-Oseguera, A., Simon, S.A., Rosenbaum, T., 2008. TRPV1: on the road to pain relief. *Curr Mol Pharmacol* 1, 255-269.
- Joseph, S.K., Williams, R.J., Corkey, B.E., Matschinsky, F.M., Williamson, J.R., 1984. The effect of inositol trisphosphate on Ca<sup>2+</sup> fluxes in insulin-secreting tumor cells. *J Biol Chem* 259, 12952-12955.
- Kanjhan, R., Coulson, E.J., Adams, D.J., Bellingham, M.C., 2005. Tertiapin-Q blocks recombinant and native large conductance K<sup>+</sup> channels in a use-dependent manner. *J Pharmacol Exp Ther* 314, 1353-1361.
- Karlson, R., 1983. Disturbance and monopolization of a spatial resource by *Zoanthus sociatus* (Coelenterata, Anthozoa). *Bull. Mar. Sci.* 33, 118-131.

- Kong, K.C., Tobin, A.B., 2011. The role of M(3)-muscarinic receptor signaling in insulin secretion. *Commun Integr Biol* 4, 489-491.
- Kyriazis, G.A., Soundarapandian, M.M., Tyrberg, B., 2012. Sweet taste receptor signaling in beta cells mediates fructose-induced potentiation of glucose-stimulated insulin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, E524-532.
- Lakshmi, V., Saxena, A., Pandey, K., Bajpai, P., Misra-Bhattacharya, S., 2004. Antifilarial activity of *Zoanthus* species (Phylum Coelenterata, Class Anthzoa) against human lymphatic filaria, *Brugia malayi*. *Parasitol Res* 93, 268-273.
- Lange, I., Yamamoto, S., Partida-Sanchez, S., Mori, Y., Fleig, A., Penner, R., 2009. TRPM2 functions as a lysosomal Ca<sup>2+</sup>-release channel in beta cells. *Sci Signal* 2, ra23.
- Larsen, J.B., Lane, C.E., 1970. Some effects of *Physalia physalis* toxin on active Na<sup>+</sup> transport across frog skin. *Comp Biochem Physiol* 34, 333-338.
- Latham, A.N., 1978. Effect of data transformation on t-test sensitivity. *Br J Clin Pharmacol* 6, 535-537.
- Leech, C.A., Holz, G.G.t., Habener, J.F., 1994. Voltage-independent calcium channels mediate slow oscillations of cytosolic calcium that are glucose dependent in pancreatic beta-cells. *Endocrinology* 135, 365-372.
- Li, F., Zhang, Z.M., 2009. Comparative identification of Ca<sup>2+</sup> channel expression in INS-1 and rat pancreatic beta cells. *World J Gastroenterol* 15, 3046-3050.
- Li, M., Yu, Y., Yang, J., 2011. Structural biology of TRP channels. *Adv Exp Med Biol* 704, 1-23.
- Linnaeus, C., 1758. *Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. Tomus I*, 1-824.
- Little, M.J., Wilson, H., Zappia, C., Cestele, S., Tyler, M.I., Martin-Eauclaire, M.F., Gordon, D., Nicholson, G.M., 1998. Delta-atracotoxins from Australian funnel-web spiders compete with scorpion alpha-toxin binding on both rat brain and insect sodium channels. *FEBS Lett* 439, 246-252.
- Liu, D., Zhu, Z., Tepel, M., 2008. The role of transient receptor potential channels in metabolic syndrome. *Hypertens Res* 31, 1989-1995.
- Loredo, J.S., Gonzalez, R.R., Jr., Hessinger, D.A., 1985. Vascular effects of *Physalia physalis* venom in the skeletal muscle of the dog. *J Pharmacol Exp Ther* 232, 301-304.
- Loredo, J.S., Gonzalez, R.R., Jr., Hessinger, D.A., 1986. Effect of Portuguese man-of-war venom on isolated vascular segments. *J Pharmacol Exp Ther* 236, 140-143.
- Majumdar, I., Mastrandrea, L.D., 2012. Serum sphingolipids and inflammatory mediators in adolescents at risk for metabolic syndrome. *Endocrine* 41, 442-449.
- Malaise, W.J., Boschero, A.C., 1977. Calcium antagonists and islet function. XI. Effect of nifedipine. *Horm Res* 8, 203-209.

- Marigo, V., Courville, K., Hsu, W.H., Feng, J.M., Cheng, H., 2009. TRPM4 impacts on Ca<sup>2+</sup> signals during agonist-induced insulin secretion in pancreatic beta-cells. *Mol Cell Endocrinol* 299, 194-203.
- Marshall, N.J., Liang, L., Bodkin, J., Dessapt-Baradez, C., Nandi, M., Collot-Teixeira, S., Smillie, S.J., Lalgı, K., Fernandes, E.S., Gnudi, L., Brain, S.D., 2012. A role for TRPV1 in influencing the onset of cardiovascular disease in obesity. *Hypertension* 61, 246-252.
- Mas, R., Menendez, R., Garateix, A., Garcia, M., Chavez, M., 1989. Effects of a high molecular weight toxin from *Physalia physalis* on glutamate responses. *Neuroscience* 33, 269-273.
- Matavel, A.C., Ferreira-Alves, D.L., Beirao, P.S., Cruz, J.S., 1998. Tension generation and increase in voltage-activated Na<sup>+</sup> current by crostamine. *Eur J Pharmacol* 348, 167-173.
- Matsunaga, S., Jimbo, M., Gill, M.B., Wyhe, L.L., Murata, M., Nonomura, K., Swanson, G.T., Sakai, R., 2011. Isolation, amino acid sequence and biological activities of novel long-chain polyamine-associated peptide toxins from the sponge *Axinyssa aculeata*. *Chembiochem* 12, 2191-2200.
- McCoy, D.D., Zhou, L., Nguyen, A.K., Watts, A.G., Donovan, C.M., McKemy, D.D., 2013. Enhanced insulin clearance in mice lacking TRPM8 channels. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 305, E78-88.
- Mears, D., 2004. Regulation of insulin secretion in islets of Langerhans by Ca(2+)channels. *J Membr Biol* 200, 57-66.
- Melnyk, A., Himms-Hagen, J., 1995. Resistance to aging-associated obesity in capsaicin-desensitized rats one year after treatment. *Obes Res* 3, 337-344.
- Menendez, R., Mas, R., Garateix, A., Garcia, M., Chavez, M., 1990. Effects of a high molecular weight polypeptidic toxin from *Physalia physalis* (Portuguese man-of-war) on cholinergic responses. *Comp Biochem Physiol C* 95, 63-69.
- Mergler, S., Skrzypski, M., Sassek, M., Pietrzak, P., Pucci, C., Wiedenmann, B., Strowski, M.Z., 2012. Thermo-sensitive transient receptor potential vanilloid channel-1 regulates intracellular calcium and triggers chromogranin A secretion in pancreatic neuroendocrine BON-1 tumor cells. *Cell Signal* 24, 233-246.
- Moore, S., Smyth, W.F., Gault, V.A., O'Kane, E., McClean, S., 2009. Mass spectrometric characterisation and quantitation of selected low molecular mass compounds from the venom of *Haplopelma lividum* (Theraphosidae). *Rapid Commun Mass Spectrom* 23, 1747-1755.
- Morales-Lazaro, S.L., Simon, S.A., Rosenbaum, T., 2013. The role of endogenous molecules in modulating pain through TRPV1. *J Physiol*.
- Moran, Y., Gordon, D., Gurevitz, M., 2009. Sea anemone toxins affecting voltage-gated sodium channels--molecular and evolutionary features. *Toxicon* 54, 1089-1101.



- Morenilla-Palao, C., Planells-Cases, R., Garcia-Sanz, N., Ferrer-Montiel, A., 2004. Regulated exocytosis contributes to protein kinase C potentiation of vanilloid receptor activity. *J Biol Chem* 279, 25665-25672.
- Motter, A.L., Ahern, G.P., 2012. TRPA1 is a polyunsaturated fatty acid sensor in mammals. *PLoS One* 7, e38439.
- Mouhat, S., Jouirou, B., Mosbah, A., De Waard, M., Sabatier, J.M., 2004. Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. *Biochem J* 378, 717-726.
- Murtaugh, L.C., 2007. Pancreas and beta-cell development: from the actual to the possible. *Development* 134, 427-438.
- Navarro-Tableros, V., Fiordeliso, T., Hernandez-Cruz, A., Hiriart, M., 2007a. Nerve growth factor promotes development of glucose-induced insulin secretion in rat neonate pancreatic beta cells by modulating calcium channels. *Channels (Austin)* 1, 408-416.
- Navarro-Tableros, V., Fiordeliso, T., Hernandez-Cruz, A., Hiriart, M., 2007b. Physiological development of insulin secretion, calcium channels, and GLUT2 expression of pancreatic rat beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292, E1018-1029.
- Nieto-Posadas, A., Jara-Oseguera, A., Rosenbaum, T., 2011. TRP channel gating physiology. *Curr Top Med Chem* 11, 2131-2150.
- Nieto-Posadas, A., Picazo-Juarez, G., Llorente, I., Jara-Oseguera, A., Morales-Lazaro, S., Escalante-Alcalde, D., Islas, L.D., Rosenbaum, T., 2012. Lysophosphatidic acid directly activates TRPV1 through a C-terminal binding site. *Nat Chem Biol* 8, 78-85.
- Nilius, B., Talavera, K., Owsianik, G., Prenen, J., Droogmans, G., Voets, T., 2005. Gating of TRP channels: a voltage connection? *J Physiol* 567, 35-44.
- Noguchi, K., Sakanashi, M., Matsuzaki, T., Nakasone, J., Koyama, T., Hamadate, N., 2005. Cardiovascular effects and lethality of venom from nematocysts of the box-jellyfish *Chiropsalmus quadrigatus* (Habu-kurage) in anaesthetized rats. *Toxicon* 45, 519-526.
- Oliveira, J.S., Fuentes-Silva, D., Zaharenko, A.J., 2009. Sea anemone peptides. Biological activities, structure-function relationships and phylogenetics aspects. *Animal toxins: state of the art . Perspectives in health and biotechnology Editora UFMG, Belo Horizonte*, 49-71.
- Oliveira, J.S., Redaelli, E., Zaharenko, A.J., Cassulini, R.R., Konno, K., Pimenta, D.C., Freitas, J.C., Clare, J.J., Wanke, E., 2004. Binding specificity of sea anemone toxins to Nav 1.1-1.6 sodium channels: unexpected contributions from differences in the IV/S3-S4 outer loop. *J Biol Chem* 279, 33323-33335.
- Ortman, B.D., Bucklin, A., Pages, F., Youngbluth, M., 2010. DNA Barcoding the Medusozoa using mtCOI. *Deep-Sea Research II* 57, 2148-2156.

Osborne, J.W., 2010. Improving your data transformations: Applying the Box-Cox transformation, *Practical Assessment, Research & Evaluation*, pp. 1-8. Available online: <http://pareonline.net/getvn.asp?v=15&n=12>.

Othman, A., Rutti, M.F., Ernst, D., Saely, C.H., Rein, P., Drexel, H., Porretta-Serapiglia, C., Lauria, G., Bianchi, R., von Eckardstein, A., Hornemann, T., 2012. Plasma deoxysphingolipids: a novel class of biomarkers for the metabolic syndrome? *Diabetologia* 55, 421-431.

Owsianik, G., Talavera, K., Voets, T., Nilius, B., 2006. Permeation and selectivity of TRP channels. *Annu Rev Physiol* 68, 685-717.

Oya, M., Suzuki, H., Watanabe, Y., Sato, M., Tsuboi, T., 2011. Amino acid taste receptor regulates insulin secretion in pancreatic beta-cell line MIN6 cells. *Genes Cells* 16, 608-616.

Philipson, L.H., Kusnetsov, A., Larson, T., Zeng, Y., Westermarck, G., 1993. Human, rodent, and canine pancreatic beta-cells express a sodium channel alpha 1-subunit related to a fetal brain isoform. *Diabetes* 42, 1372-1377.

Phillips, L.K., Prins, J.B., 2011. Update on incretin hormones. *Ann N Y Acad Sci* 1243, E55-74.

Plant, T.D., 1988. Na<sup>+</sup> currents in cultured mouse pancreatic B-cells. *Pflugers Arch* 411, 429-435.

Polak, M., Scharfmann, R., Seilheimer, B., Eisenbarth, G., Dressler, D., Verma, I.M., Potter, H., 1993. Nerve growth factor induces neuron-like differentiation of an insulin-secreting pancreatic beta cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5781-5785.

Pressel, D.M., Mislser, S., 1990. Sodium channels contribute to action potential generation in canine and human pancreatic islet B cells. *J Membr Biol* 116, 273-280.

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 Suppl 1, S183-189.

Razavi, R., Chan, Y., Afifyan, F.N., Liu, X.J., Wan, X., Yantha, J., Tsui, H., Tang, L., Tsai, S., Santamaria, P., Driver, J.P., Serreze, D., Salter, M.W., Dosch, H.M., 2006. TRPV1<sup>+</sup> sensory neurons control beta cell stress and islet inflammation in autoimmune diabetes. *Cell* 127, 1123-1135.

Rodriguez-Diaz, R., Caicedo, A., 2013. Novel approaches to studying the role of innervation in the biology of pancreatic islets. *Endocrinol Metab Clin North Am* 42, 39-56.

Roe, M.W., Worley, J.F., 3rd, Qian, F., Tamarina, N., Mittal, A.A., Dralyuk, F., Blair, N.T., Mertz, R.J., Philipson, L.H., Dukes, I.D., 1998. 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, 10402-10410.

- Rosenbaum, T., Sanchez-Soto, M.C., Hiriart, M., 2001. Nerve growth factor increases insulin secretion and barium current in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 50, 1755-1762.
- Rosenbaum, T., Vidaltamayo, R., Sanchez-Soto, M.C., Zentella, A., Hiriart, M., 1998. Pancreatic beta cells synthesize and secrete nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7784-7788.
- Russo, A.J., Calton, G.J., Burnett, J.W., 1983. The relationship of the possible allergic response to jellyfish envenomation and serum antibody titers. *Toxicon* 21, 475-480.
- Sakura, H., Ashcroft, F.M., 1997. Identification of four trp1 gene variants murine pancreatic beta-cells. *Diabetologia* 40, 528-532.
- Sanchez-Rodriguez, J., Cruz-Vazquez, K., 2006. Isolation and biological characterization of neurotoxic compounds from the sea anemone *Lebrunia danae* (Duchassaing and Michelotti, 1860). *Arch Toxicol* 80, 436-441.
- Scott, R.H., Sutton, K.G., Dolphin, A.C., 1993. Interactions of polyamines with neuronal ion channels. *Trends Neurosci* 16, 153-160.
- Schagger, H., von Jagow, G., 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166, 368-379.
- Schweitz, H., Bruhn, T., Guillemare, E., Moinier, D., Lancelin, J.M., Beress, L., Lazdunski, M., 1995. Kalicludines and kaliseptine. Two different classes of sea anemone toxins for voltage sensitive K<sup>+</sup> channels. *J Biol Chem* 270, 25121-25126.
- Sher, D., Zlotkin, E., 2009. A hydra with many heads: protein and polypeptide toxins from hydra and their biological roles. *Toxicon* 54, 1148-1161.
- Sher, E., Biancardi, E., Pollo, A., Carbone, E., Li, G., Wollheim, C.B., Clementi, F., 1992. omega-Conotoxin-sensitive, voltage-operated Ca<sup>2+</sup> channels in insulin-secreting cells. *Eur J Pharmacol* 216, 407-414.
- Shiomi, K., 2009. Novel peptide toxins recently isolated from sea anemones. *Toxicon* 54, 1112-1118.
- Siemens, J., Zhou, S., Piskorowski, R., Nikai, T., Lumpkin, E.A., Basbaum, A.I., King, D., Julius, D., 2006. Spider toxins activate the capsaicin receptor to produce inflammatory pain. *Nature* 444, 208-212.
- Steen, R., Muscatine, L., 1984. Daily budgets of photosynthetically fixed carbon in symbiotic zoanths. *Biol. Bull.* 167, 477-487.
- Stein, A.T., Ufret-Vincenty, C.A., Hua, L., Santana, L.F., Gordon, S.E., 2006. Phosphoinositide 3-kinase binds to TRPV1 and mediates NGF-stimulated TRPV1 trafficking to the plasma membrane. *J Gen Physiol* 128, 509-522.
- Su, J.H., Chiang, M.Y., Wen, Z.H., Dai, C.F., Hsu, C.H., Sheu, J.H., 2010. Sesquiterpenoids from the formosan soft coral *Sinularia leptoclados*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 58, 250-253.

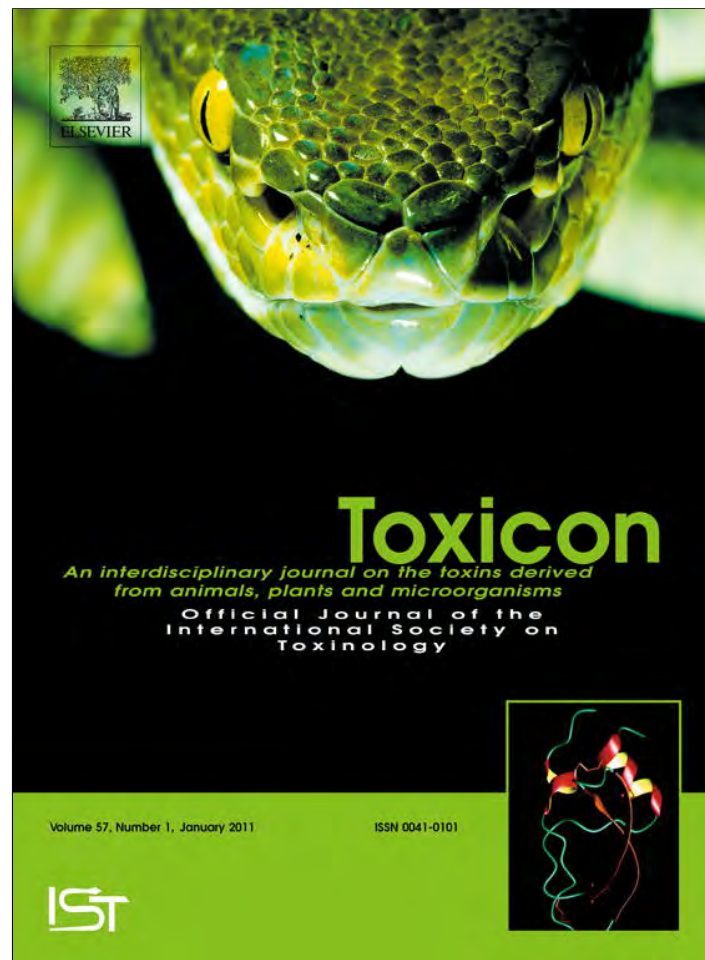
- Sufrin, J.R., Finckbeiner, S., Oliver, C.M., 2009. Marine-derived metabolites of S-adenosylmethionine as templates for new anti-infectives. *Mar Drugs* 7, 401-434.
- Suput, D., 2009. In vivo effects of cnidarian toxins and venoms. *Toxicon* 54, 1190-1200.
- Swartz, K.J., MacKinnon, R., 1995. An inhibitor of the Kv2.1 potassium channel isolated from the venom of a Chilean tarantula. *Neuron* 15, 941-949.
- Swayne, L.A., Mezghrani, A., Varrault, A., Chemin, J., Bertrand, G., Dalle, S., Bourinet, E., Lory, P., Miller, R.J., Nargeot, J., Monteil, A., 2009. The NALCN ion channel is activated by M3 muscarinic receptors in a pancreatic beta-cell line. *EMBO Rep* 10, 873-880.
- Tamarina, N.A., Kuznetsov, A., Fridlyand, L.E., Philipson, L.H., 2005. Delayed-rectifier (KV2.1) regulation of pancreatic beta-cell calcium responses to glucose: inhibitor specificity and modeling. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289, E578-585.
- Tamkun, M.M., Hessinger, D.A., 1981. Isolation and partial characterization of a hemolytic and toxic protein from the nematocyst venom of the Portuguese Man-of-War, *Physalia physalis*. *Biochim Biophys Acta* 667, 87-98.
- Tanaka, H., Shimaya, A., Kiso, T., Kuramochi, T., Shimokawa, T., Shibasaki, M., 2011. Enhanced insulin secretion and sensitization in diabetic mice on chronic treatment with a transient receptor potential vanilloid 1 antagonist. *Life Sci* 88, 559-563.
- Toyama, M.H., Carneiro, E.M., Marangoni, S., Barbosa, R.L., Corso, G., Boschero, A.C., 2000. Biochemical characterization of two crotamine isoforms isolated by a single step RP-HPLC from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom and their action on insulin secretion by pancreatic islets. *Biochim Biophys Acta* 1474, 56-60.
- Turk, T., Macek, P., Suput, D., 1995. Inhibition of acetylcholinesterase by a pseudozoanthoxanthin-like compound isolated from the zoanthid *Parazoanthus axinellae* (O. Schmidt). *Toxicon* 33, 133-142.
- Uchida, K., Dezaki, K., Damdindorj, B., Inada, H., Shiuchi, T., Mori, Y., Yada, T., Minokoshi, Y., Tominaga, M., 2011. Lack of TRPM2 impaired insulin secretion and glucose metabolisms in mice. *Diabetes* 60, 119-126.
- Uchida, K., Tominaga, M., 2011a. The role of thermosensitive TRP (transient receptor potential) channels in insulin secretion. *Endocr J*.
- Uchida, K., Tominaga, M., 2011b. The role of thermosensitive TRP (transient receptor potential) channels in insulin secretion. *Endocr J* 58, 1021-1028.
- Uchida, K., Tominaga, M., 2011c. TRPM2 modulates insulin secretion in pancreatic beta-cells. *Islets* 3, 209-211.
- Uechi, G., Toma, H., Arakawa, T., Sato, Y., 2011. Characterization of a novel proteinous toxin from sea anemone *Actinaria villosa*. *Protein J* 30, 422-428.

- Varela, C., Guitart, B., Ortiz, M., Lalana, R., 2002. Los zoantídeos (Cnidaria, Anthozoa, Zoanthiniaria), de la región occidental de Cuba. *Rev. Invest. Mar.* 23, 179-184.
- Venkatachalam, K., Montell, C., 2007. TRP channels. *Annu Rev Biochem* 76, 387-417.
- Vennekens, R., Olausson, J., Meissner, M., Bloch, W., Mathar, I., Philipp, S.E., Schmitz, F., Weissgerber, P., Nilius, B., Flockerzi, V., Freichel, M., 2007. Increased IgE-dependent mast cell activation and anaphylactic responses in mice lacking the calcium-activated nonselective cation channel TRPM4. *Nat Immunol* 8, 312-320.
- Vetter, I., Lewis, R.J., 2011. Natural product ligands of TRP channels. *Adv Exp Med Biol* 704, 41-85.
- Vidaltamayo, R., Sanchez-Soto, M.C., Hiriart, M., 2002. Nerve growth factor increases sodium channel expression in pancreatic beta cells: implications for insulin secretion. *FASEB J* 16, 891-892.
- Vidaltamayo, R., Sanchez-Soto, M.C., Rosenbaum, T., Martinez-Merlos, T., Hiriart, M., 1996. Neuron-like phenotypic changes in pancreatic beta-cells induced by NGF, FGF, and dbcAMP. *Endocrine* 4, 19-26.
- Villar, R.M., Gil-Longo, J., Daranas, A.H., Souto, M.L., Fernandez, J.J., Peixinho, S., Barral, M.A., Santafe, G., Rodriguez, J., Jimenez, C., 2003. Evaluation of the effects of several zoanthamine-type alkaloids on the aggregation of human platelets. *Bioorg Med Chem* 11, 2301-2306.
- Wagner, T.F., Drews, A., Loch, S., Mohr, F., Philipp, S.E., Lambert, S., Oberwinkler, J., 2010. TRPM3 channels provide a regulated influx pathway for zinc in pancreatic beta cells. *Pflugers Arch* 460, 755-765.
- Wagner, T.F., Loch, S., Lambert, S., Straub, I., Mannebach, S., Mathar, I., Dufer, M., Lis, A., Flockerzi, V., Philipp, S.E., Oberwinkler, J., 2008. Transient receptor potential M3 channels are ionotropic steroid receptors in pancreatic beta cells. *Nat Cell Biol* 10, 1421-1430.
- Waluk, D.P., Vielfort, K., Derakhshan, S., Aro, H., Hunt, M.C., 2012. N-Acyl taurines trigger insulin secretion by increasing calcium flux in pancreatic beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun* 430, 54-59.
- Wang, P., Yan, Z., Zhong, J., Chen, J., Ni, Y., Li, L., Ma, L., Zhao, Z., Liu, D., Zhu, Z., 2012. Transient receptor potential vanilloid 1 activation enhances gut glucagon-like peptide-1 secretion and improves glucose homeostasis. *Diabetes* 61, 2155-2165.
- Williams, J.A., Day, M., Heavner, J.E., 2008. Ziconotide: an update and review. *Expert Opin Pharmacother* 9, 1575-1583.
- Worley, J.F., 3rd, McIntyre, M.S., Spencer, B., Dukes, I.D., 1994. Depletion of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores activates a maitotoxin-sensitive nonselective cationic current in beta-cells. *J Biol Chem* 269, 32055-32058.

- Yan, P., Deng, Z., van Ofwegen, L., Proksch, P., Lin, W., 2010. Lobophytone O-T, new biscebranoids and cebranoid from soft coral *Lobophytum pauciflorum*. *Mar Drugs* 8, 2837-2848.
- Yang, R.G., Xi, N., Lai, K.W., Zhong, B.H., Fung, C.K., Qu, C.G., Wang, D.H., 2011. Nanomechanical analysis of insulinoma cells after glucose and capsaicin stimulation using atomic force microscopy. *Acta Pharmacol Sin* 32, 853-860.
- Yanos, J.G., 2011. The role of alpha-, delta- and F cells in insulin secretion and action. *Diabetes Res Clin Pract* 93 Suppl 1, S25-26.
- Zhang, Z., Zhang, W., Jung, D.Y., Ko, H.J., Lee, Y., Friedline, R.H., Lee, E., Jun, J., Ma, Z., Kim, F., Tsitsilianos, N., Chapman, K., Morrison, A., Cooper, M.P., Miller, B.A., Kim, J.K., 2012. TRPM2 Ca<sup>2+</sup> channel regulates energy balance and glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302, E807-816.
- Zhu, Z., Luo, Z., Ma, S., Liu, D., 2011. TRP channels and their implications in metabolic diseases. *Pflugers Arch* 461, 211-223.

## ANEXOS

Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.



(This is a sample cover image for this issue. The actual cover is not yet available at this time.)

This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>





Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Toxicol

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

## Low molecular weight compounds from *Zoanthus sociatus* impair insulin secretion via $\text{Ca}^{+2}$ influx blockade and cause glucose intolerance *in vivo*

Carlos Manlio Diaz-Garcia<sup>a,1</sup>, Carmen Sanchez-Soto<sup>a</sup>, Deyanira Fuentes-Silva<sup>b</sup>, Carolina Leon-Pinzon<sup>a</sup>, Dany Dominguez-Perez<sup>c</sup>, Carlos Varela<sup>d</sup>, Adela Rodriguez-Romero<sup>b</sup>, Olga Castañeda<sup>e</sup>, Marcia Hiriart<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Fisiología Celular, División de Neurociencias, Departamento de Neurodesarrollo y Fisiología. Universidad Nacional Autónoma de México Ciudad Universitaria, Circuito Ext. UNAM, Coyoacán CP04510, México D.F., Mexico

<sup>b</sup> Instituto de Química, Departamento de Biomacromoléculas, Universidad Nacional Autónoma de México Ciudad Universitaria, Circuito Ext. UNAM, Coyoacán CP 04510, México D.F., Mexico

<sup>c</sup> Departamento de Biología, Universidad Central "Martha Abreu" de Las Villas, Carretera a Camajuaní Km 5½, Santa Clara, CP 50100, Cuba

<sup>d</sup> Acuario Nacional de Cuba, Avenida 3ra, Esquina 62, Miramar Playa, Ciudad de La Habana, CP 10400, Cuba

<sup>e</sup> Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Calle 25 No. 455 Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana, CP 10400, Cuba

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 3 October 2011

Received in revised form 17 November 2011

Accepted 23 November 2011

Available online 6 December 2011

#### Keywords:

Toxin

Voltage-gated  $\text{Ca}^{+2}$  channels

Insulin

### ABSTRACT

Cnidarians comprise a taxon with a high biodiversity of cytotoxic, neurotoxic and cardiotoxic compounds, which have not been studied on insulin release. We tested the effect of a crude extract of *Zoanthus sociatus* (Ellis, 1767) and the low molecular weight fraction of this extract on insulin secretion in isolated rat  $\beta$ -cells and also in a glucose tolerance test *in vivo*.

We observed that the extract inhibited insulin release by reducing the amount secreted by individual  $\beta$ -cells and also by silencing a fraction of the secreting population. This effect coincided with a diminished rise of intracellular  $\text{Ca}^{+2}$  in response to high glucose and high  $\text{K}^{+}$ -induced depolarization. Moreover intraperitoneal administration of the low molecular weight fraction produced glucose intolerance in adult rats.

The active fraction exhibited molecular weights similar to the neurotoxins described in the phylum. Our results broaden the toxic effects of cnidarian venoms and show evidence of potential modulators of voltage-gated  $\text{Ca}^{+2}$  channels in this group.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

\* Corresponding author. Instituto de Fisiología Celular, División de Neurociencias, Universidad Nacional Autónoma de México Ciudad Universitaria, Circuito Ext. UNAM, Coyoacán, CP 04510 México DF, Mexico. Tel.: +52 55 56225665; fax: +52 55 56225747.

E-mail addresses: [cmanlio@email.ifc.unam.mx](mailto:cmanlio@email.ifc.unam.mx) (C.M. Diaz-Garcia), [csanchez@ifc.unam.mx](mailto:csanchez@ifc.unam.mx) (C. Sanchez-Soto), [dfuentess@yahoo.com.mx](mailto:dfuentess@yahoo.com.mx) (D. Fuentes-Silva), [cleon@email.ifc.unam.mx](mailto:cleon@email.ifc.unam.mx) (C. Leon-Pinzon), [danydp@uclv.edu.cu](mailto:danydp@uclv.edu.cu) (D. Dominguez-Perez), [varelacarlos933@gmail.com](mailto:varelacarlos933@gmail.com) (C. Varela), [adela@unam.mx](mailto:adela@unam.mx) (A. Rodriguez-Romero), [ocp@infomed.sld.cu](mailto:ocp@infomed.sld.cu) (O. Castañeda), [mhiriart@ifc.unam.mx](mailto:mhiriart@ifc.unam.mx) (M. Hiriart).

<sup>1</sup> Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

### 1. Introduction

The Phylum Cnidaria is a potential source for the discovery of novel toxins. The presence of cnidocysts, specialized organelles in the production of toxic substances, characterizes this taxon and confers mechanisms of predation and/or self protection. The biodiversity of coelenterates venoms in the Caribbean reefs has been of great interest to toxinologists but is still largely underexplored. Moreover, research on *in vivo* effects is rare compared with cellular or molecular studies (Suput, 2009).

Most of the data about biological actions of these venoms concern hemolysis (Alvarez et al., 2009), neurotoxicity (Sanchez-Rodriguez and Cruz-Vazquez, 2006) and cardiotoxicity (Noguchi et al., 2005), but none to our knowledge, are concerned with insulin release modulation, despite the large number of organisms with toxins that modulate the excitability of pancreatic  $\beta$ -cells (Diaz-Garcia et al., 2010). Coupling between the rise in blood glucose levels and insulin release involve activity of different ionic channels, reviewed elsewhere (Hiriart and Aguilar-Bryan, 2008), which determine changes in membrane potential that reaches a plateau with superimposed spikes (Henquin and Meissner, 1984). The mechanism that triggers insulin exocytosis resembles that of neurotransmitters, and toxins affecting synapses could also modulate insulin secretion.

In this work we explore the ability of a crude extract from *Zoanthus sociatus* (Ellis, 1767), and one of its low molecular weight fractions, to modulate insulin secretion. *Z. sociatus* (Cnidaria, Anthozoa, Zoantharia, Zoanthidea, Zoanthidae) is distributed along the Tropical western Atlantic. The specimens can be found as colonies at 1–1.5 m deep (Varela et al., 2002) consisting in zooids of more than 1 cm long and approximately 0.5 cm of diameter (Fig. 1). They present a symbiotic relationship with zooxanthellae, which constitute an important source of fixed carbon (Steen and Muscatine, 1984) and also exhibit a high rate of regeneration (Karlson, 1983). Interestingly, there are no reports of bioactive peptides from zoanths, but some organic compounds have been detected, such as the potent hemolytic palytoxin (Gleibs et al., 1995), and a pseudo-zoanthoxanthin-like inhibitor of acetylcholinesterase was detected in *Parazoanthus axinellae* (Turk et al., 1995). In the specie of interest, there have been reports of alkaloids with different actions upon human platelet aggregation (Villar et al., 2003) and also an antifilarial activity in its chloroform methanol extract (Lakshmi et al., 2004).



**Fig. 1.** *Zoanthus sociatus*. The specie forms colonies of several cylindrical zooids of approximately 1 cm height.

We analyzed the active low molecular weight fraction from the crude extract by ESI mass spectrometry, and found that it contains molecules below 7 kDa that inhibit  $\text{Ca}^{+2}$  entry and insulin secretion in isolated  $\beta$ -cells, causing *in vivo* glucose intolerance.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemical and reagents

Reagents were obtained from the following sources: collagenase P from Roche,  $\omega$ -conotoxin GVIA from Alomone; bovine serum albumin (BSA), 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), poly-L-lysine, trypsin, Trypan blue solution, insulin and all salts of electrophysiological recordings from Sigma (St. Louis, MO); tissue culture dishes from Corning (Corning, NY); fetal bovine serum from Equitech-BIO (Ingram, TX); Hanks' balanced salt solution (HBSS), RPMI-1640 salts, and penicillin-streptomycin-amphotericin B solution from Life Technologies (Grand Island, NY). Trifluoroacetic acid (TFA) and ammonium acetate were purchased from Sigma, and acetonitrile (ACN) from Burdick & Jackson.

### 2.2. Sample collection

*Z. sociatus* specimens were collected at the National Aquarium of Cuba, La Habana, Cuba. The specimens were brought to the laboratory alive, washed and kept in clean saline water until required for experiments.

### 2.3. Crude extract preparation

The crude extract was prepared according to a modified protocol from a method previously described (Gómez et al., 1986). Briefly, stolonal bases were removed from the zooid column and cut in small pieces. The biological material was homogenized in ice-cold water (1:1 w/v) with blender and subjected to autolysis during five to ten periods of 5 s at room temperature. The final lysate was clarified through a layer of spun glass and subsequently centrifuged twice at 1145 g for 30 min at 4 °C. The supernatant was recovered, lyophilized and stored at –20 °C until it was used.

### 2.4. SDS-PAGE

SDS-PAGE was performed according to the method of (Schagger and von Jagow, 1987) under reducing conditions. The discontinuous separating gel contained 10% (1 cm long) and 16% acrylamide. Proteins and peptides in the crude extract were stained with Coomassie R-250 Brilliant Blue for determination of their relative molecular weight.

### 2.5. Purification procedures

Lyophilized crude extract was resuspended in 0.1 M ammonium acetate buffer pH 6.7 at a final concentration of 2.5 mg/ml, and filtered through a 0.22  $\mu\text{m}$  Millipore membrane (Millipore, Billerica, USA). Aliquots of this sample were subjected to gel filtration on a HiLoad 16/20

Superdex 75 column and their elution diagrams recorded. The column was previously equilibrated and eluted with the sample buffer (0.1 M ammonium acetate buffer pH 6.7) in an Akta FPLC System (GE Healthcare, USA) at a flow rate of 1 ml/min. The low molecular weight fractions exhibiting insulin secretion inhibitory activity were pooled and loaded onto a Phenomenex ODS-3 reverse phase column previously equilibrated with 0.1% aqueous trifluoroacetic acid (TFA). Peptides were eluted using a linear gradient from 0% to 100% of acetonitrile containing 0.12% TFA, at a flow rate of 1 ml/min. The protein concentration was determined by spectrophotometry using a bicinchoninic acid kit for protein determination (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Samples were read at 562 nm with a Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader (Biotek Instruments, Inc., Vermont, USA).

## 2.6. Mass spectrometry

Mass spectrometry of the active fraction was performed using an Esquire 6000 mass spectrometer (Bruker, Bremen, Germany), equipped with an electrospray-ionization source and an ion-trap detector. The ions were formed from an aqueous solution containing 1% formic acid and 2 mg/ml of sample. Approximately 50  $\mu$ l of sample was introduced into the ESI source at a flow rate of 5  $\mu$ l/min using a syringe pump. The capillary temperature and the spray voltage were kept at 200 °C and 278.5 V, respectively. The mass scan range was 200–6000 Da, for 4.4 min total scan time, with 3 s scan time and 0.1 s interscan time. Ion peaks were observed in the positive ionization mode with  $m/z$  values between 2000 and 6000 Da. Data acquisition and mass spectra were processed with the Compass software (Bruker, Bremen, Germany).

## 2.7. Culture of pancreatic $\beta$ -cells

All methods used in this study were approved by the Animal Care Committee of the Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Animal care was performed according to the “*International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals*”, (Council for International Organizations of Medical Sciences, 2010). Wistar rats were obtained from the local animal facility, maintained in a 14:10-h light–dark cycle (0600–2000), and allowed free access to standard laboratory rat diet and tap water. On the day of the experiments, animals were anesthetized with intraperitoneal pentobarbital sodium (40 mg/kg), and, after pancreas dissection, animals were killed by cervical dislocation.

Pancreatic  $\beta$ -cells were obtained following the technique previously described (Diaz-Villasenor et al., 2006). Briefly, pancreatic islets were isolated and separated from the acinar tissue by collagenase digestion and a Ficoll gradient centrifugation; clean islets were then handpicked. Dissociation of the cells was achieved by incubating them in a shaker bath for 10 min at 37 °C in calcium-free Spinner solution, with 15.6 mM glucose, 0.5% bovine serum albumin, and 0.01% trypsin, followed by mechanical disruption. Single cells were cultured for 1 day in RPMI-1640

supplemented with 5% fetal calf serum, 200 units/ml penicillin G, 200 mg/ml streptomycin, and 0.5 mg/ml amphotericin B.

## 2.8. Reverse hemolytic plaque assay (RHPA)

To identify insulin-secreting cells, RHPA (Neill and Frawley, 1983) was performed as described previously (Aguayo-Mazzucato et al., 2006). Briefly, after 1 day in culture, islet cells were detached from culture dishes, and equal volumes of islet cells were mixed with *Staphylococcus aureus* protein A-coated sheep erythrocytes, introduced to Cunningham chambers previously treated with poly-L-lysine to promote cell attachment, and incubated for 1 h.

Experiments were carried out at 5.6 or 15.6 mM glucose with or without each toxin in the presence of insulin antiserum, and then incubated with guinea pig complement. Insulin released was revealed by the presence of hemolytic plaques around the secreting cells (Supplemental Fig. 1), which result from the complement mediated lysis of erythrocytes bearing insulin–anti-insulin complexes bound to protein A.

Each coverslip was scanned at a 100 $\times$  or 400 $\times$  magnification with a Leika Micro Dissection System 6000 (version 6.4.1.2887) coupled to a Hitachi HV-D20 camera, and measuring their diameters with the aid of the image analyzer software ImageJ from NIH, USA (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). The plaque size was expressed as area, and the cells that formed plaques were counted. These results were expressed as the percentage of insulin-secreting cells; at least 50 cells were counted per replicate in each experimental condition, in each culture. All experiments were performed in duplicate.

The effect of the active fraction on the overall glucose-induced secretory activity of  $\beta$ -cells was also calculated as a secretion index, by multiplying the average plaque area by the percentage of plaque-forming cells (Hiriart and Ramirez-Medeles, 1991). A frequency distribution of immunoplaque areas was constructed with data pooled from three different experiments by duplicate to identify functional subpopulations of  $\beta$ -cells and to determine whether these subpopulations were differentially affected by the experimental treatments. According to the presence of different secreting subpopulations (Hiriart and Ramirez-Medeles, 1993), we considered two classifications: small plaque-forming cells (SP: area of immunoplaques  $\leq 2000 \mu\text{m}^2$ ) and large plaque-forming cells (LP: area  $> 2000 \mu\text{m}^2$ ) (Rosenbaum et al., 2001; Sanchez-Soto et al., 1999).

## 2.9. Cell viability

Cell viability was obtained by Trypan blue exclusion assay. Briefly, 25,000 cells were plated in 96 well microplates and incubated with 200  $\mu$ l of supplemented RPMI-1640 medium during 8 h. Media was replaced by an equivalent solution to that used in the RHPA, by adding 50  $\mu$ l of control or treatment-containing HBSS medium to each well. Finally 0.4% of HBSS-diluted (1:10) Trypan blue solution was added and after 3 min, blue-stained cells (dead cells) and bright living cells were counted. At least 100 cells from three random fields were analyzed and the

percentage of living cells was calculated by dividing the number of living cells by the total number of counted cells.

### 2.10. Calcium measurement

Cells were plated in glass coverslips coated with 0.5 mg/ml Poly-L-Lysine. After 24 h of culture, cells were loaded during 30 min with 1  $\mu$ M of the  $\text{Ca}^{+2}$  indicator Fluo-4AM (Molecular Probes) in the HBSS supplemented with 10  $\mu$ g/ml gentamycin and 0.1% BSA, washed with the same medium (2 volumes) and allowed to equilibrate for 20 min  $\beta$ -cells were viewed through a 100 $\times$  oil immersion objective (ApoTIRF Nikon) and epifluorescence was measured with a 488 nm excitation and 535 nm emission using a Nikon Eclipse TE200 microscope and a TILL Photonics Imaging System. Images were acquired every second with an exposition time of 20 ms for 10 min at 23  $^{\circ}$ C. 25.6 mM glucose or 40 mM KCl were applied previous to 180 or 120 image of each sequence respectively, in both control and toxin-treated cells. Sequence files were analyzed using the image analyzer software ImageJ from NIH, USA (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). Regions of interest were selected in the cytoplasm of the cells and the average pixel intensity was measured. The relative fluorescence changes ( $\Delta F/F_0$ ) were plotted as a function of time and integrated to determine the area under the curve.

### 2.11. Glucose tolerance test

Glucose (2 g/kg body weight) was injected intraperitoneally in control (saline) and treated (*Z. sociatus* active fraction at 300  $\mu$ g/kg body weight) 8 weeks-old male Wistar rats. Samples were obtained via tail bleeding. Blood glucose levels were measured at 0 (before glucose injection) and 15, 30, 60, 90, 120 and 180 min after glucose using

commercial blood glucose meter (Accu-Chek Active, Roche).

### 2.12. Data analysis

Comparisons were performed by a *t*-student test using GraphPad InStat version 3.00 (GraphPad Software, San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Graphics were constructed using Origin version 7 (OriginLab Corporation, Northampton USA, [www.OriginLab.com](http://www.OriginLab.com)).

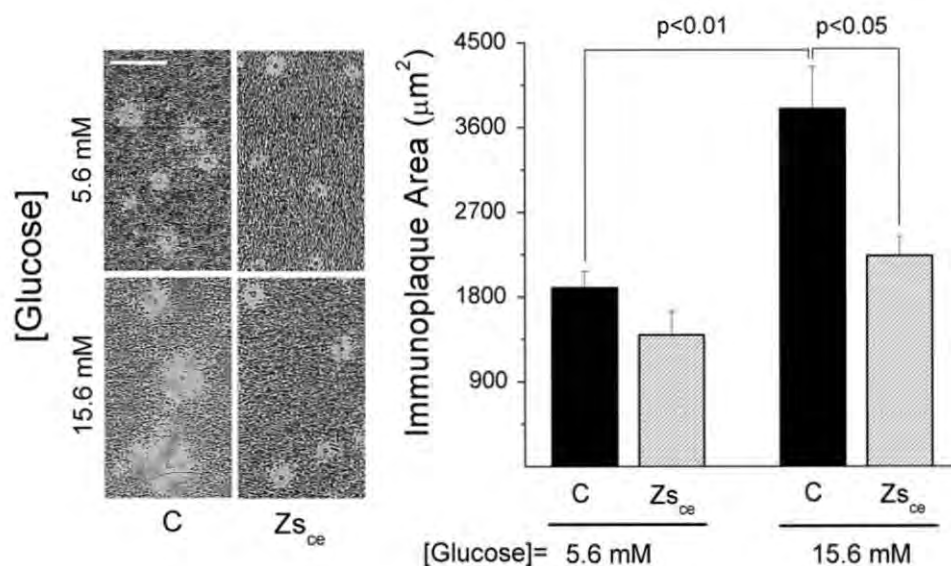
## 3. Results

### 3.1. Effect of *Z. sociatus* crude extract on insulin secretion

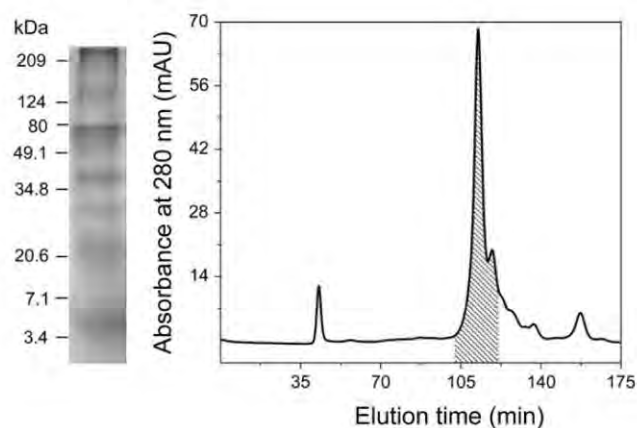
Beta cells were incubated for 1 h in the presence of insulin antiserum, with *Z. sociatus* crude extract ( $Zs_{ce}$  50  $\mu$ g/ml protein concentration). High glucose caused a 2-fold increase in insulin secretion in control conditions, but only a 1.6-fold increase in  $Zs_{ce}$  treated cells. The lower glucose-response was due to a significant decrease (40%) in the insulin-immunoplaque area that surrounded the secreting cells. This area is proportional to the insulin secreted by the individual cell (Fig. 2).

### 3.2. Purification procedures of *Z. sociatus* low molecular weight fraction

$Zs_{ce}$  showed various bands ranging from hundreds to less than 10 kDa when run in an SDS-PAGE electrophoresis. We isolated the low molecular weight fraction ( $Zs_{LW}$ ) using a gel filtration chromatography with a Superdex 75 column. The inhibitory activity of insulin secretion was recovered from the most prominent peak of the chromatogram (Fig. 3). The mass spectrometry analysis of this pooled



**Fig. 2.** Effect of *Z. sociatus* crude extract on insulin secretion of native pancreatic  $\beta$ -cells. *Left Panel:* Photomicrographs of immunoplaque areas (IPA<sup>+</sup>) measured by a Reverse Hemolytic Plaque Assay (RHPA) in each condition specified. Scale bar 200  $\mu$ m. *Right Panel:* Comparison of IPA (ordinates) among conditions (abscissa). Letters C and  $Zs_{ce}$  denote control and *Z. sociatus* crude extract (50  $\mu$ g/ml) respectively. IPA values are represented by bars, mean  $\pm$  SEM of 3 different experiments by duplicate, where at least 50 cells were measured per chamber. (\*) immunoplaque areas are dark regions around beta cells, which were formed by 1 h incubation of islet cells in 5.6 mM or 15.6 mM glucose, in the presence of an insulin antibody and complement. Immunoplaque areas are directly proportional to the insulin secreted by the isolated cells.

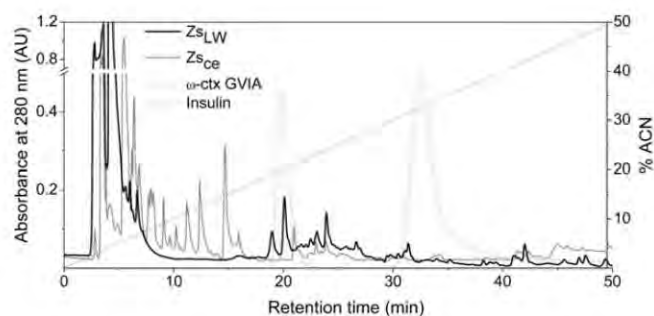


**Fig. 3.** SDS-PAGE and gel filtration chromatography of *Z. sociatus* crude extract. *Left Panel:* Denaturing electrophoresis of *Z. sociatus* crude extract showed a complex mixture of proteins from more than 200–3.4 kDa. To obtain a good resolution of both high and low molecular weight proteins, a discontinuous separating gel of 10–16 % was used. *Right Panel:* The chromatogram at 280 nm, obtained by gel filtration, is characterized by a major peak of low molecular weight compounds whose mass spectra show molecular weights beneath 7 kDa. The shaded region represent the pooled fractions where the inhibitory activity upon insulin secretion was recovered.

fraction displayed four major molecules whose molecular weights were, in descending order of abundance: 6397.7, 4179.1, 4874.7 and 2131.2 Da. Moreover, when injected onto an analytic C18 column of RP-HPLC,  $Z_{sLW}$  (15  $\mu\text{g}$ ) presented an enriched region of peaks respect to crude extract (130  $\mu\text{g}$ ), whose retention times were between those of  $\omega$ -conotoxin GVIA (100  $\mu\text{g}$ ) and insulin (30  $\mu\text{g}$ ; Fig. 4).

### 3.3. Effect of the low molecular weight fraction on insulin secretion

$Z_{sLW}$  (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) reduced glucose stimulated insulin secretion by more than 60% (Fig. 5 left). This effect was only significant at the high glucose concentration, in which the active fraction fully depressed insulin secretion to a value similar to that observed in basal conditions (5.6 mM glucose).  $Z_{sLW}$  also diminished the percentage of insulin-secreting cells, thus, reinforcing the reduction of the overall insulin secretion (Supplemental Fig. 2). The later can be



**Fig. 4.** Analytic C18 RP-HPLC of *Z. sociatus* crude extract and the low molecular weight fraction. The chromatogram at 280 nm shows an enriched region in the low molecular weight fraction ( $Z_{sLW}$ ) respect to crude extract ( $Z_{sce}$ ), with retention times close or comprised between those corresponding to the small compact peptides  $\omega$ -conotoxin GVIA ( $\omega$ -ctx GVIA) and insulin.

explained by a decrease in the large forming-plaque subpopulation of  $\beta$ -cells (Fig. 5 right) as revealed by histograms of immunoplaque areas (Supplemental Fig. 3).  $Z_{sLW}$  retained the ability to impair insulin secretion when  $\beta$ -cells were incubated with a depolarizing concentration of KCl (Supplemental Fig. 4).

### 3.4. Low molecular weight fraction inhibition of glucose-induced calcium elevation in isolated $\beta$ -cells

The raise in extracellular glucose concentration from 5.6 mM to 25.6 mM also increased the  $\text{Ca}^{+2}$ -sensitive fluorescence of Fluo-4AM, which remained high during the recording time. This behavior decreased after the application of 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$   $Z_{sLW}$ , and was recovered after the washout with normal HBSS (Supplemental Fig. 5). Areas under the curves of glucose stimulated  $\text{Ca}^{+2}$  dynamics were measured as an indicative of  $\text{Ca}^{+2}$  entries to the cell, and compared between conditions.  $Z_{sLW}$  treated cells exhibit significantly lower values with respect both to control and to washout conditions, which were statistically undistinguishable from each other (Fig. 6).

### 3.5. Low molecular weight fraction inhibition of KCl-induced calcium elevation in isolated $\beta$ -cells

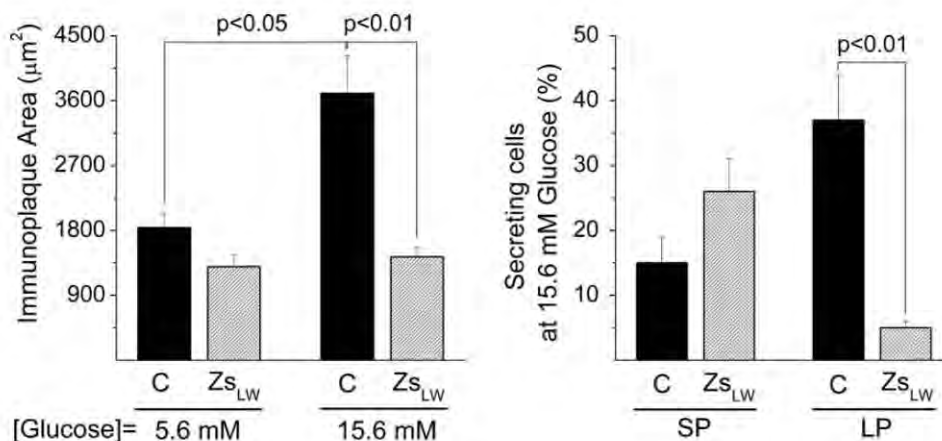
Potassium depolarization (40 mM KCl), increased  $\text{Ca}^{+2}$  fluorescence of  $\beta$ -cells. In this condition, the  $\text{Na}^{+}$  channel blocker tetrodotoxin (TTX 100 nM) decreased both, the peak and sustained phases of the signal, and 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$   $Z_{sLW}$  diminished it even more (Supplemental Fig. 6). The effect of  $Z_{sLW}$  was similar to that of L-type  $\text{Ca}^{+2}$  channel blocker nifedipine (10  $\mu\text{M}$ ). Furthermore,  $Z_{sLW}$  and nifedipine combined did not cause greater inhibition than that obtained separately by each one (Fig. 7).

### 3.6. *Z. sociatus* low molecular weight fraction causes glucose intolerance in vivo

The inoculation of  $Z_{sLW}$  at a dose of 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  during an intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) caused a significant elevation of plasma glucose in treated rats with respect to control ones at all times recorded. The return blood glucose to its basal level was also delayed by the application of the active fraction (Fig. 8). The overall change in glucose level could be better estimated by comparison of the areas under the curves, being of around a 1.8-fold increased when measured from time 0–2 h:  $160 \pm 12$  normalized  $\text{AU} \cdot \text{min}$  of controls against  $286 \pm 39$  of the  $Z_{sLW}$  treated group ( $n = 4$ ;  $p < 0.05$ ).

## 4. Discussion

Since composition of *Z. sociatus* crude extract is heterogeneous and has a broad range of molecular weights, a gel filtration chromatography with a Superdex 75 column was used. The active fractions collected strongly absorb in the UV region (280 nm) and comprise a mixture of low molecular weight compounds. Interestingly, the majority of the molecular weights determined by mass fall in the range where many neurotoxins have been described for the



**Fig. 5.** Effect of the low molecular weight fraction on insulin secretion of native pancreatic  $\beta$ -cells. *Left Panel:* Ordinates show the immunoplaque area measured by RHPA in control (C) and in low molecular weight fraction (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) treated cells ( $Zs_{LW}$ ). *Right Panel:* Percentage of SP and LP secreting cells in the same experimental conditions when incubated at 15.6 mM glucose. Values are represented by bars, mean  $\pm$  SEM of 3 different experiments by duplicate, where at least 50 cells were measured per chamber.

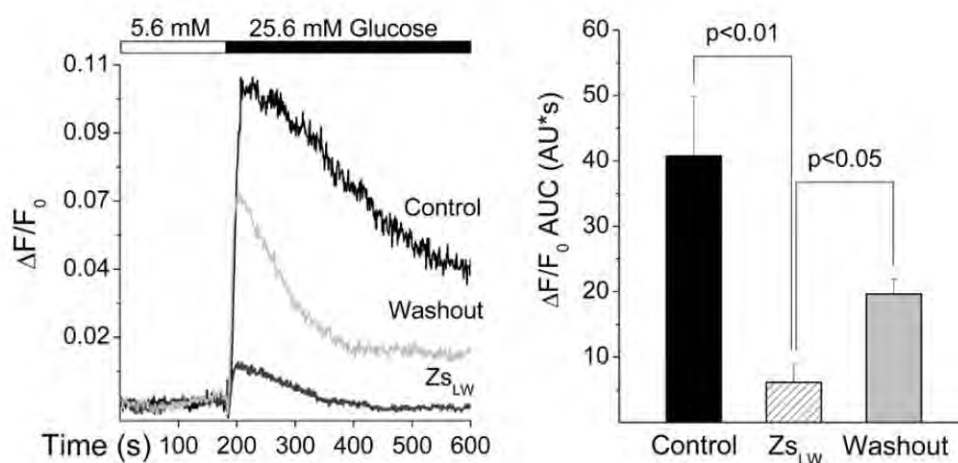
phylum cnidaria, from 3 to 6.5 kDa (Castaneda and Harvey, 2009; Moran et al., 2009). Moreover, those toxins present a compact structure due to the presence of several disulfide bonds and a variety of folding motifs, also present in neurotoxins from other phyla (Mouhat et al., 2004).

In an attempt to identify molecules with similar hydrophobic characteristics to those small peptides, the C18 RP-HPLC chromatogram of crude extract and the active pooled fraction were obtained and the retention times of its components were compared to those of  $\omega$ -conotoxin GVIA and insulin. Even though, none of these standards are cnidarian neurotoxins, their structures and sizes are close to the limits of the molecular weight range of peptide cnidarian neurotoxins. The latter varies from 3.8 to 6 kDa and shows a compact structure, which resemble those molecules that were used for comparison. The  $Zs_{LW}$  fraction shows a chromatogram with a higher relative abundance of peaks in the region between 20 and 40% ACN. Precisely, the retention times of both standards flanked this region, which could be indicative of the presence of small peptides with related structures.

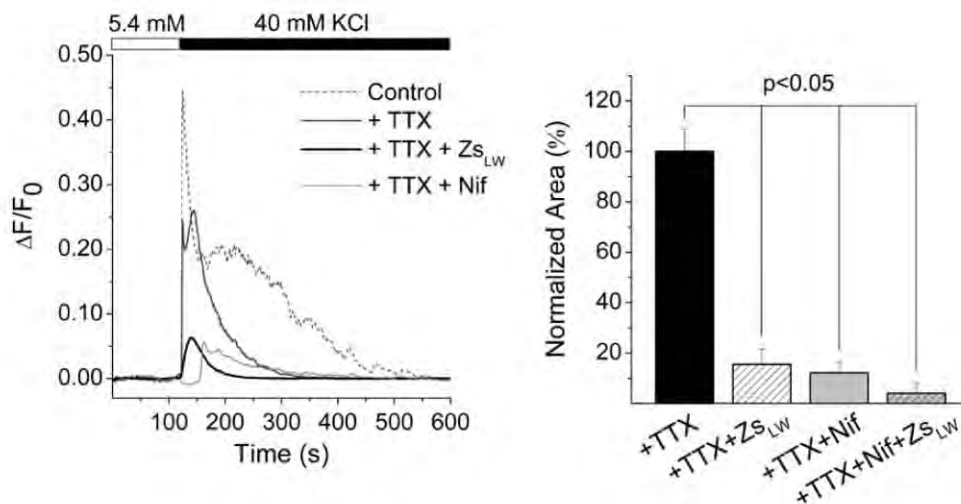
The inhibition of insulin secretion observed in the presence of the low molecular weight fraction is similar to that caused by the crude extract, but at the same concentration  $Zs_{LW}$  exhibited a further 20% reduction in insulin secretion, reaching 60% compared to controls. It is known that both, the specific activity and the purity of the bioactive compounds increase with each purification step.

The inhibition of overall insulin secretion can be estimated by calculating the secretion index (Hiriart et al., 2001), which equals the immunoplaque area multiplied by the fraction of secreting cells (F). As observed,  $Zs_{LW}$  decreases both IPA and F, mainly the percentage of LP cells, at 15.6 mM glucose; thus, the overall inhibition was around 77%. Those parameters have been useful reflecting the modulation of growth factors, hormones and neurotransmitters, but also from exogenous substances that affect both individual secretion and the proportion of insulin-secreting cells (Hiriart and Ramirez-Medeles, 1993; Rosenbaum et al., 2001; Vidaltamayo et al., 2002).

The inhibition of insulin secretion by both the crude extract and the active fraction cannot be attributed to toxic



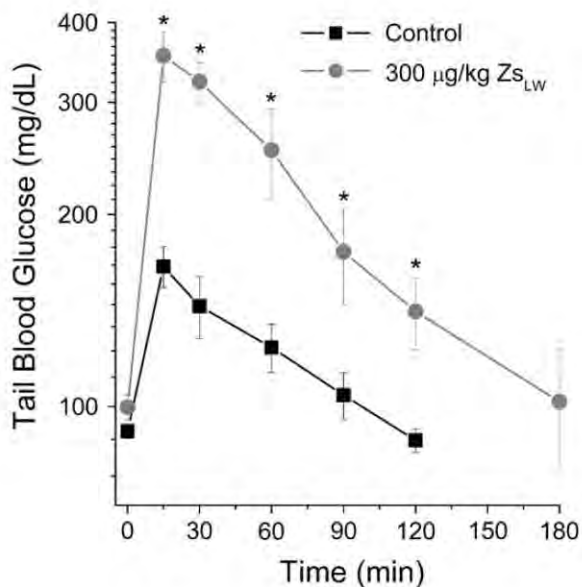
**Fig. 6.** Low molecular weight fraction inhibition of glucose-induced calcium elevation in isolated  $\beta$ -cells. *Left Panel:* Representative traces of glucose stimulated calcium-induced fluorescence increases in control, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$   $Zs_{LW}$  treated cells and after fraction washout. *Right Panel:* Comparison of areas under the curve (AUC) in each condition ( $n = 7, 9$  and  $4$  for control,  $Zs_{LW}$  and washout respectively). Values are represented by bars, mean  $\pm$  SEM.



**Fig. 7.** Low molecular weight fraction inhibition of KCl-induced calcium elevation in isolated  $\beta$ -cells. *Left Panel:* Representative traces of KCl-stimulated fluorescence increases in control, 100 nM TTX, 50  $\mu$ g/ml  $Zs_{LW}$  and 10  $\mu$ M nifedipine (Nif) treated cells. *Right Panel:* Comparison of normalized areas under the curve among TTX ( $n = 12$ ), TTX plus  $Zs_{LW}$  ( $n = 9$ ) or Nif ( $n = 6$ ), and a combination of all treatments ( $n = 5$ ). Values are represented by bars, mean  $\pm$  SEM.

effects since none of them affect viability (Supplemental Fig. 7) and  $\beta$ -cells recovered the ability to rise the cytosolic  $Ca^{+2}$  in response to high glucose, after  $Zs_{LW}$  washout.

High KCl causes a depolarization of approximately 40 mV in membrane potential of intact mice  $\beta$ -cells (Hatlapatka et al., 2009). Depolarization directly activates the voltage dependent channels and causes an oscillatory pattern in  $\beta$ -cells membrane potential and  $Ca^{+2}$  influx, which in turn augments insulin exocytosis (Hiriart and Aguilar-Bryan, 2008). The marked effect of  $Zs_{LW}$  on  $Ca^{+2}$  oscillations could be on the VDCC channels, which would be activated at high glucose levels and are responsible for most of the insulin secretion.



**Fig. 8.** Intraperitoneal glucose tolerance test. Plot shows tail glucose level variation after intraperitoneal inoculation of 2 mg/kg glucose in 4 animals per group. Treated rats with 300  $\mu$ g/kg of  $Zs_{LW}$  presented higher glucose levels respect to controls during the entire experiment and recovered their basal level 1 h later. \* $p < 0.05$  for time-paired comparisons.

In order to examine this possibility, 100 nM TTX was added to the medium to block the contribution of  $Na^{+}$  channels to membrane depolarization and VDCC activation, and thus isolating the contribution of the latter to  $Ca^{+2}$  signal. It is worth mentioning that TTX reduced  $Ca^{+2}$  fluorescence in response to 40 mM KCl which points out to the relevance of voltage dependent  $Na^{+}$  channels in the physiology of insulin secretion, as previously proposed (Hiriart and Matteson, 1988). The remaining  $Ca^{+2}$  signal, due to a direct activation of VDCC, was diminished by 50  $\mu$ g/ml  $Zs_{LW}$  at the same extent of 10  $\mu$ M L-type  $Ca^{+2}$  channel blocker nifedipine (Malaisse and Boscher, 1977). Moreover, no extra effect was observed when they were co-applied, indicating that they both act through the same molecular target. We have previously demonstrated that nifedipine has the same effects, measured by the RHPA (Rosenbaum et al., 2001). Nifedipine reduced both the immunoplaque area and the percentage of insulin-secreting cells in stimulating concentrations of glucose, as occurred with  $Zs_{LW}$ .

Despite that most of the reported neurotoxins acts upon  $Na^{+}$  and  $K^{+}$  channels (Honma and Shiomi, 2006), and so far, none low molecular weight toxin had been described as a VDCC modulator in cnidarians, our results open a promising field of research. Recently, there have been striking results in other ion channel families, such as the TRP (Transient Receptor Potential) with the reports of Cuypers et al. 2006 and Andreev et al. 2008, and the acid sensing ion channel ASIC3 inhibitor APETx2 (Diochot et al., 2004).

Finally, an IPGTT was assessed to determine if the effects observed in isolated  $\beta$ -cells from primary cultures could transcend in an *in vivo* model. A sub-lethal dose of 300  $\mu$ g/kg was selected from previous toxicological results in rodents (not published). The  $Zs_{LW}$  fraction induced a significant increase in levels at all the measuring times, and treated animals failed to return to basal levels at the same time as the controls; they took one more hour, indicating a defect in insulin secretion and/or sensitivity.

Our *in vitro* results indicate a severe impairment of insulin secretion, which leads to elevated glucose plasma levels. Similar results have been reported when several channels participating in the coupling between glucose rise and insulin secretion have been submitted to deleterious interventions, for example, TRPM5 (Colsoul et al., 2010), voltage-gated Na<sup>+</sup> channels (Ernst et al., 2009) and VDCC (Mears, 2004). Moreover, it is interesting to explore further effects of the fraction components upon the autonomous system fibers that innervate the pancreatic islets, or the rest of the cells from those islets, which may exert paracrine modulation on  $\beta$ -cells or even upon the sensitivity to insulin in peripheral tissues, which taken together could enhance the elevation of glucose levels.

It is possible that the inhibition of insulin secretion and the resulting elevation in blood glucose level is part of a generalized affection of many excitable cells. The toxic effects of *Z. sociatus* low molecular weight compounds could affect also key physiological process such as cardiac activity or synapses; this is an interesting issue to consider.

## 5. Conclusions

In the present study we report for the first time a modulation of insulin secretion by a cnidarian extract. We showed that some compounds from *Z. sociatus* with molecular weights in the range of those reported as neurotoxins in the phylum are responsible for the inhibitory effect. The mechanism of action relay on a reduction of Ca<sup>2+</sup> influx to  $\beta$ -cells, presumably by L-type VDCCs. The inhibition of insulin secretion can be potent enough to cause hyperglycemia *in vivo* when the venom active fraction is intraperitoneally inoculated after a high glucose challenge. Our findings confirm the potential of unexplored cnidarians species for the discovery of new activities, some of them of fundamental importance in biomedicine, and shed light on the possibility of VDCC modulators in the phylum which would be a novel family of peptide neurotoxins.

## Acknowledgements

We are grateful to Dr. F. Fernández de Miguel for its contribution to Ca<sup>2+</sup> imaging experiments. To Álvaro Caso, for proofreading and discussion. To Drs. A. Gómez Puyou and Tuena for lending us the freeze-drying equipment. To Ana María Escalante Gonzalbo, Francisco Pérez Eugenio and Efrén A. Robledo, from the Computer Unit and Félix Sierra, for excellent technical support. To C. Rivero, H. Malagón, Sara Cruz and all the bioterium staff. All from the Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Also to Acela Pedroso from Instituto de Endocrinología de Cuba for liophylization and photographer Rafael Mesa for *Z. sociatus* picture. To A.S. Gandini for his help with artwork. This work was supported by Gobierno del Distrito Federal PICDS08-72, CONACYT CB2009-131647, and DGAPA-PAPIIT IN215611, Universidad Nacional Autónoma de México. Carlos Manlio Díaz-García was supported by a doctoral fellowship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

## Conflict of interest

None.

## Appendix. Supplementary Data

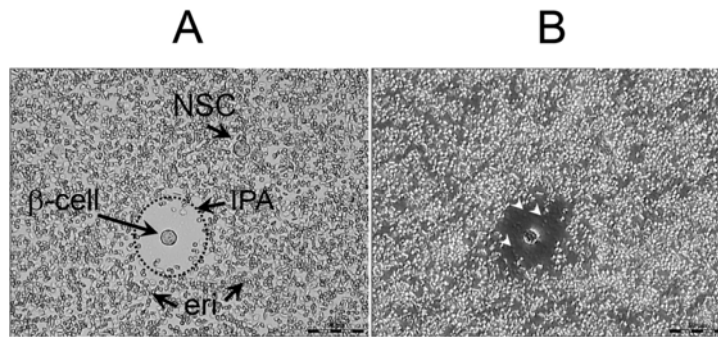
Supplementary data related to this article can be found online at doi:10.1016/j.toxicon.2011.11.019.

## References

- Aguayo-Mazzucato, C., Sanchez-Soto, C., Godinez-Puig, V., Gutierrez-Ospina, G., Hiriart, M., 2006. Restructuring of pancreatic islets and insulin secretion in a postnatal critical window. *PLoS One* 1, e35.
- Alvarez, C., Mancheno, J.M., Martinez, D., Tejuca, M., Pazos, F., Lanio, M.E., 2009. Sticholysins, two pore-forming toxins produced by the Caribbean Sea anemone *Stichodactyla helianthus*: their interaction with membranes. *Toxicon* 54, 1135–1147.
- Andreev, Y.A., Kozlov, S.A., Koshlev, S.G., Ivanova, E.A., Monastyrnaya, M. M., Kozlovskaya, E.P., Grishin, E.V., 2008. Analgesic compound from sea anemone *Heteractis crispa* is the first polypeptide inhibitor of vanilloid receptor 1 (TRPV1). *J. Biol. Chem.* 283, 23914–23921.
- Castaneda, O., Harvey, A.L., 2009. Discovery and characterization of cnidarian peptide toxins that affect neuronal potassium ion channels. *Toxicon* 54, 1119–1124.
- Colsoul, B., Schraenen, A., Lemaire, K., Quintens, R., Van Lommel, L., Segal, A., Owsianik, G., Talavera, K., Voets, T., Margolskee, R.F., Kokrashvili, Z., Gilon, P., Nilius, B., Schuit, F.C., Vennekens, R., 2010. Loss of high-frequency glucose-induced Ca<sup>2+</sup> oscillations in pancreatic islets correlates with impaired glucose tolerance in *Trpm5*<sup>-/-</sup> mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 5208–5213.
- Cuypers, E., Yanagihara, A., Karlsson, E., Tytgat, J., 2006. Jellyfish and other cnidarian envenomations cause pain by affecting TRPV1 channels. *FEBS Lett.* 580, 5728–5732.
- Diaz-Garcia, C.M., Sanchez-Soto, C., Hiriart, M., 2010. Toxins that modulate ionic channels as tools for exploring insulin secretion. *Cell Mol. Neurobiol.* 30, 1275–1281.
- Diaz-Villasenor, A., Sanchez-Soto, M.C., Cebrian, M.E., Ostrosky-Wegman, P., Hiriart, M., 2006. Sodium arsenite impairs insulin secretion and transcription in pancreatic beta-cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 214, 30–34.
- Diochot, S., Baron, A., Rash, L.D., Deval, E., Escoubas, P., Scanzello, S., Salinas, M., Lazdunski, M., 2004. A new sea anemone peptide, APETx2, inhibits ASIC3, a major acid-sensitive channel in sensory neurons. *EMBO J.* 23, 1516–1525.
- Ellis, J., 1767. An account of the *Actinia Sociata*, or clustered animal-flower, lately found on the sea-coasts of the New-Ceded Islands: in a letter from John Ellis, Esquire, F. R. S. to the right honourable the Earl of Hillsborough, F. R. S. *Phil. Trans.* 57, 428–437.
- Ernst, S.J., Aguilar-Bryan, L., Noebels, J.L., 2009. Sodium channel beta1 regulatory subunit deficiency reduces pancreatic islet glucose-stimulated insulin and glucagon secretion. *Endocrinology* 150, 1132–1139.
- Gleibs, S., Mebs, D., Werdning, B., 1995. Studies on the origin and distribution of palytoxin in a Caribbean coral reef. *Toxicon* 33, 1531–1537.
- Gómez, T., Romero, D.L., Wong, L., Barral, A.M., Martínez, J.R., Chávez, M.A., 1986. Isolation and partial purification of two toxins and a protease inhibitor from *Stoichactis helianthus* anemone. *Rev. Cubana Invest. Biom.* 5, 117–125.
- Hatlapatka, K., Willenborg, M., Rustenbeck, I., 2009. Plasma membrane depolarization as a determinant of the first phase of insulin secretion. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 297, E315–E322.
- Henquin, J.C., Meissner, H.P., 1984. Significance of ionic fluxes and changes in membrane potential for stimulus-secretion coupling in pancreatic B-cells. *Experientia* 40, 1043–1052.
- Hiriart, M., Aguilar-Bryan, L., 2008. Channel regulation of glucose sensing in the pancreatic beta-cell. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295, E1298–E1306.
- Hiriart, M., Matteson, D.R., 1988. Na channels and two types of Ca channels in rat pancreatic B cells identified with the reverse hemolytic plaque assay. *J. General Physiology* 91, 617–639.
- Hiriart, M., Ramirez-Medeles, M.C., 1991. Functional subpopulations of individual pancreatic B-cells in culture. *Endocrinology* 128, 3193–3198.
- Hiriart, M., Ramirez-Medeles, M.C., 1993. Muscarinic modulation of insulin secretion by single pancreatic beta-cells. *Mol. Cellular Endocrinology* 93, 63–69.

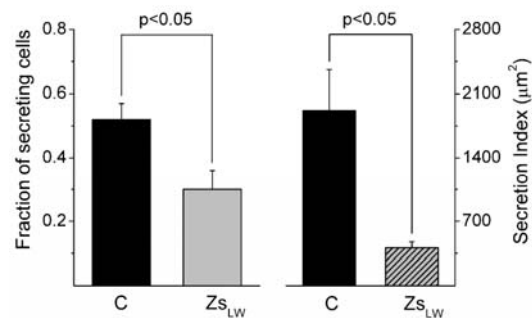


- Hiriart, M., Vidaltamayo, R., Sanchez-Soto, M.C., 2001. Nerve and fibroblast growth factors as modulators of pancreatic beta cell plasticity and insulin secretion. *Isr. Med. Assoc. J.* 3, 114–116.
- Honma, T., Shiomi, K., 2006. Peptide toxins in sea anemones: structural and functional aspects. *Mar. Biotechnol. (NY)* 8, 1–10.
- Karlson, R., 1983. Disturbance and monopolization of a spatial resource by *Zoanthus sociatus* (Coelenterata, Anthozoa). *Bull. Mar. Sci.* 33, 118–131.
- Lakshmi, V., Saxena, A., Pandey, K., Bajpai, P., Misra-Bhattacharya, S., 2004. Antifilarial activity of *Zoanthus* species (Phylum Coelenterata, Class Anthozoa) against human lymphatic filaria, *Brugia malayi*. *Parasitol. Res.* 93, 268–273.
- Malaisse, W.J., Boschero, A.C., 1977. Calcium antagonists and islet function. XI. Effect of nifedipine. *Horm. Res.* 8, 203–209.
- Mears, D., 2004. Regulation of insulin secretion in islets of Langerhans by Ca(2+) channels. *J. Membr. Biol.* 200, 57–66.
- Moran, Y., Gordon, D., Gurevitz, M., 2009. Sea anemone toxins affecting voltage-gated sodium channels—molecular and evolutionary features. *Toxicon* 54, 1089–1101.
- Mouhat, S., Jouirou, B., Mosbah, A., De Waard, M., Sabatier, J.M., 2004. Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. *Biochem. J.* 378, 717–726.
- Neill, J.D., Frawley, L.S., 1983. Detection of hormone release from individual cells in mixed populations using a reverse hemolytic plaque assay. *Endocrinology* 112, 1135–1137.
- Noguchi, K., Sakanashi, M., Matsuzaki, T., Nakasone, J., Koyama, T., Hamadate, N., 2005. Cardiovascular effects and lethality of venom from nematocysts of the box-jellyfish *Chiropsalmus quadrigatus* (Habu-kurage) in anaesthetized rats. *Toxicon* 45, 519–526.
- Rosenbaum, T., Sanchez-Soto, M.C., Hiriart, M., 2001. Nerve growth factor increases insulin secretion and barium current in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 50, 1755–1762.
- Sanchez-Rodriguez, J., Cruz-Vazquez, K., 2006. Isolation and biological characterization of neurotoxic compounds from the sea anemone *Lebrunia danae* (Duchassaing and Michelotti, 1860). *Arch. Toxicol.* 80, 436–441.
- Sanchez-Soto, M.C., Larrieta, M.E., Vidaltamayo, R., Hiriart, M., 1999. Heterogeneity in glutamic acid decarboxylase expression among single rat pancreatic beta cells. *Diabetologia* 42, 1086–1092.
- Schagger, H., von Jagow, G., 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166, 368–379.
- Steen, R., Muscatine, L., 1984. Daily budgets of photosynthetically fixed carbon in symbiotic zoanthids. *Biol. Bull.* 167, 477–487.
- Suput, D., 2009. In vivo effects of cnidarian toxins and venoms. *Toxicon* 54, 1190–1200.
- Turk, T., Macek, P., Suput, D., 1995. Inhibition of acetylcholinesterase by a pseudozoanthoxanthin-like compound isolated from the zoanthid *Parazoanthus axinellae* (O. Schmidt). *Toxicon* 33, 133–142.
- Varela, C., Guitart, B., Ortiz, M., Lalana, R., 2002. Los zoantídeos (Cnidaria, Anthozoa, Zoanthiniaria), de la región occidental de Cuba. *Rev. Invest. Mar.* 23, 179–184.
- Vidaltamayo, R., Sanchez-Soto, M.C., Hiriart, M., 2002. Nerve growth factor increases sodium channel expression in pancreatic beta cells: implications for insulin secretion. *FASEB J.* 16, 891–892.
- Villar, R.M., Gil-Longo, J., Daranas, A.H., Souto, M.L., Fernandez, J.J., Peixinho, S., Barral, M.A., Santafe, G., Rodriguez, J., Jimenez, C., 2003. Evaluation of the effects of several zoanthamine-type alkaloids on the aggregation of human platelets. *Bioorg. Med. Chem.* 11, 2301–2306.



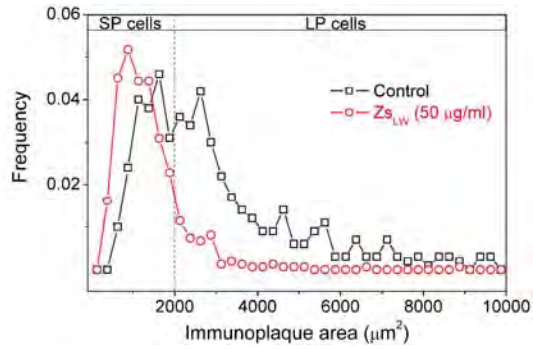
**Supplemental Fig. 1:** Reverse Hemolytic Plaque Assay (RHPA) technique to detect insulin secretion by individual  $\beta$ -cells. A: The photomicrograph shows a section of a Cunningham chamber from  $Zs_{LW}$  treated cells. Non-secreting cells (NSC) are not surrounded by plaques. A secreting  $\beta$ -cell is surrounded by an erythrocyte (eri) hemolytic immunoplaque area (IPA). B: The same region was taken through Nomarski differential interference contrast optic. The immunoplaque area is the dark region around the secreting  $\beta$ -cell, which was formed by 1-h incubation of islet cells in 15.6 mM glucose, in the presence of an insulin antibody and complement. Immunoplaque areas are directly proportional to the insulin secreted by the isolated cells. Erythrocyte ghosts can be observed inside the IPA, as indicated by the white arrowheads. Scale bars represent 50  $\mu$ m.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.11.019>



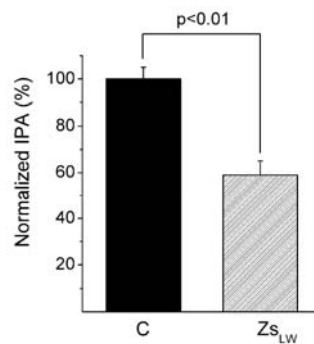
**Supplemental Fig. 2:** Effect of the active fraction on the overall secretory activity. A: Bars represent the fraction of secreting cells in 15.6 mM glucose, (C) control and ( $Zs_{LW}$ ) low molecular weight fraction treated cells (50  $\mu$ g/ml). B: Secretion index reflects the overall effect of  $Zs_{LW}$  on glucose-induced insulin secretion, obtained by multiplying mean immunoplaque area times the fraction of secreting cells. Values are represented by bars, mean  $\pm$  SEM of 3 different experiments, by duplicate.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.11.019>



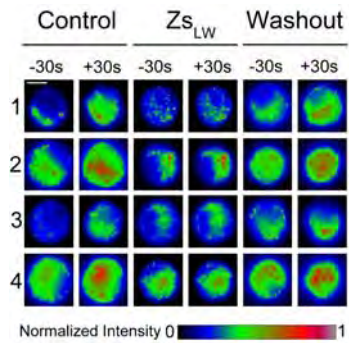
**Supplemental Fig. 3:** Histograms of immunoplaque areas. Ordinates show the frequency of immunoplaque areas (IPA) of control ( $n = 565$ ) and low molecular weight fraction ( $Z_{s,LW}$ ) treated secreting cells ( $n = 446$ ), when incubated at 15.6 mM glucose. Frequencies were calculated by counting the number of IPAs in  $250 \mu\text{m}^2$  intervals from 0 to  $10,000 \mu\text{m}^2$ , and dividing it by the total number of cells. The cutoff value at  $2000 \mu\text{m}^2$  separate two distinguishable, but overlapping secreting populations of  $\beta$ -cells, the small plaque (SP) and the large plaque (LP) forming-plaque cells.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.11.019>



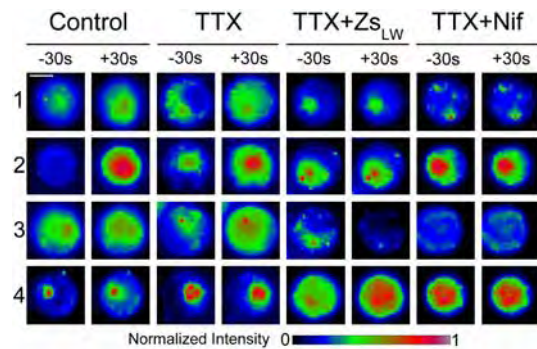
**Supplemental Fig. 4:** Effect of the low molecular weight fraction on KCl-induced insulin secretion. Ordinates show the normalized immunoplaque areas (IPA) of control (C) and low molecular weight fraction ( $50 \mu\text{g/ml}$ ) treated cells ( $Z_{s,LW}$ ), when incubated for 1 h with 30 mM KCl. Values are represented by bars, mean  $\pm$  SEM of 3 different experiments by duplicate, where at least 50 cells were measured per chamber.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.11.019>



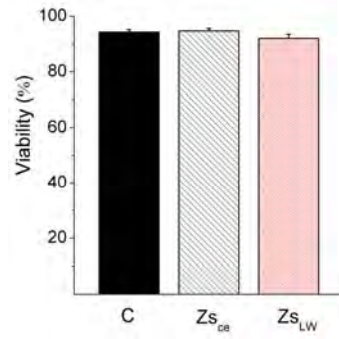
**Supplemental Fig. 5:** Characteristic glucose-induced increases in Fluo-4AM fluorescence in isolated  $\beta$ -cells. Photomicrographs of four representative cells of each experimental condition 30 s before (-30 s) and after (+30 s) glucose rise from 5.6 to 25.6 mM. The relative increase in calcium sensitive fluorescence is indicated in normalized units of intensity as shown in the calibration bar. Scale bar in the first picture represents 5  $\mu$ m.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.11.019>



**Supplemental Fig. 6:** Characteristic KCl-induced increases in Fluo-4AM fluorescence in isolated  $\beta$ -cells. Photomicrographs of four representative cells of each experimental condition 30 s before (-30 s) and after (+30 s) stimulation with 40 mM KCl. The relative increase in calcium sensitive fluorescence is indicated in normalized units of intensity as shown in the calibration bar. Scale bar in the first picture represents 5  $\mu$ m.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.11.019>



**Supplemental Fig. 7:** *Z. sociatus* crude extract and active fraction did not affect cell viability. Bars represent cell viability, expressed as percentage of living cells, (C) control, (Zs<sub>cr</sub>) *Z. sociatus* crude extract and low molecular weight fraction (50 µg/ml) treated cells (Zs<sub>LW</sub>), after 1 h incubation. Values are mean ± SEM, calculated through a Trypan blue assay, where at least 100 cells were analyzed per replicate ( $n = 3$ ).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.11.019>

# Toxins that Modulate Ionic Channels as Tools for Exploring Insulin Secretion

Carlos Manlio Diaz-Garcia · Carmen Sanchez-Soto ·  
Marcia Hiriart

Received: 31 May 2010 / Accepted: 2 September 2010 / Published online: 3 November 2010  
© Springer Science+Business Media, LLC 2010

**Abstract** Glucose-induced insulin secretion is a cardinal process in glucose homeostasis and metabolic expenditure. Uncoupling of the insulin response to glucose variations may lead to type-2 diabetes mellitus. Thus the identification of more specific drugs to facilitate the study of insulin secretion mechanisms and to develop new pharmacological agents for therapeutics is fundamental. Venomous organisms possess a great diversity of toxic molecules and some of them are neurotoxins that affect membrane excitability. This article reviews properties of those toxins affecting ion channels pivotal for insulin secretion and the usefulness of such compounds in the study of pancreatic beta-cell physiology. Here we examine the major contributions of toxinology to the understanding of the ionic phase of insulin secretion, to the determination of ion channel composition in different insulin secreting cell-line models as well as from primary cultures of different mammal species. Finally, we present a summary of the many diverse toxins affecting insulin release and a brief discussion of the potential of novel toxins in therapeutics.

**Keywords** Na channels · Ca channels · KATP channels · Pancreatic beta cells

A commentary to this article can be found at doi:  
[10.1007/s10571-010-9611-z](https://doi.org/10.1007/s10571-010-9611-z)

C. M. Diaz-García · C. Sanchez-Soto · M. Hiriart (✉)  
Instituto de Fisiología Celular, Neuroscience Division,  
Department of Neurodevelopment and Physiology, Universidad  
Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria,  
AP 70-253 Coyoacán, 04510 Mexico, DF, Mexico  
e-mail: mhiriart@ifc.unam.mx

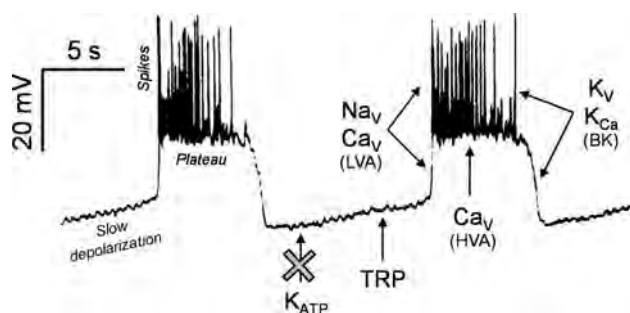
C. M. Diaz-García  
Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional  
Autónoma de México, Mexico, Mexico

## Introduction

Stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release in pancreatic beta cells depends on a rise of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  after augmented glucose transport through the plasma membrane and further catabolism of this molecule, which in turn increases the ATP/ADP ratio and promotes ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channel ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ ) closure. The latter causes a depolarization mainly dependent on the contribution of TRP channels, whose cationic nonselective currents causes a slow depolarization followed by a fast depolarization phase mediated by voltage-gated  $\text{Na}^+$  and T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels to a plateau stage determined by high voltage activation  $\text{Ca}^{2+}$  channels (mainly L-type), and superimposed bursts of action potential spikes. Finally, membrane potential decays by the activation of voltage- and calcium-gated  $\text{K}^+$  channels (Fig. 1). The complex balance among these ion channels determines an oscillating pattern in membrane potential during stimulation with high glucose (Hiriart and Aguilar-Bryan 2008).

Insulin secretion is tightly regulated by a set of endogenous secretagogues, counteracting hormones and growth factors such as acetylcholine, glucagon, and the autocrine nerve growth factor (NGF; Rosenbaum et al. 1998, 2001). However, there are many exogenous substances that also affect beta-cell physiology, like toxins, a group of bioactive compounds from venomous living beings that usually modulate ion channel activity and thus excitability, including the mechanisms of insulin secretion.

The purpose of this article is to present a review about some of the reported toxins with actions upon insulin secretion and to discuss their potential use in basic and applied research directed towards understanding beta-cell physiology.



**Fig. 1** Oscillatory activity of  $\beta$ -cell membrane potential at stimulating glucose levels. The figure shows electrical response of  $\beta$  cells to high glucose and those ion channels involved in each phase of this response are marked. ATP-sensitive  $K^+$  channel ( $K_{ATP}$ ) closure and transient receptor potential (TRP) channel opening determine slow depolarization preceding fast depolarization induced by currents through voltage-gated  $Na^+$  ( $Na_v$ ) and low voltage activated (LVA)  $Ca^{2+}$  channels. During the plateau and spike bursting, high voltage activated (HVA)  $Ca^{2+}$  channels ( $Ca_v$ ), mainly L-type, contribute to the rise of intracellular  $Ca^{2+}$  and insulin release by exocytosis. Finally, repolarization is achieved by delayed rectifiers ( $K_v$ ) and  $Ca^{2+}$ -sensitive big conductance  $K^+$  channels (BK)

### Toxins Affecting Insulin Secretion Through Voltage-Gated Sodium Channels

Tetrodotoxin (TTX) is a voltage-gated  $Na^+$  channel blocking alkaloid, firstly isolated from fish of the Tetradontidae family and from which its name is derived. Although it is well known that rodent, canine, and human beta cells express sodium channel  $\alpha_1$ -subunits (Philipson et al. 1993)

Hiriart and Matteson (1988) first demonstrated the presence of a TTX-sensitive  $Na^+$  current in rat beta cells. Using the reverse hemolytic plaque assay (RHPA), they showed a significant inhibition by TTX (200 nM) on average glucose-induced insulin secretion in individual cells, without an effect at 5 mM glucose or below. The role of  $Na^+$  channels was then related to plasma membrane depolarization and activation of voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels and the question of whether this current was essential or not for insulin secretion was solved.

TTX has been used to establish the relevance of  $Na^+$  channels in pancreatic beta cells from other species aside from rat. In human tissue, TTX (0.1  $\mu$ g/ml) abolished an inward transient current elicited at depolarized potentials, diminished glucose-induced insulin secretion in more than 50% (Hiriart and Matteson 1988; Braun et al. 2008) and at a concentration of 1  $\mu$ M reversibly abolished action potentials in canine beta cells (Pressel and Misler 1990). Plant (1988) reported for the first time a  $Na^+$  current in mouse beta cells. He also described that these channels are fully inactivated at the resting potential which accounts for insulin secretion being resistant to TTX in mice. However, Ernst et al. (2009) found a significant decrease in insulin

secretion in response to 11 mM glucose in mouse intact islets when incubated with 1  $\mu$ M TTX. Moreover, in vivo glucose intolerance and reduced response to glucose was observed in homozygous *Scn1b* null mice (unpaired  $\beta 1$  subunit activity) validating the relevance of  $Na^+$  channels and their regulatory subunits (especially Nav1.7 and  $\beta 1$ ) in mouse glucose homeostasis.

Crotamine, one of the major toxins from the venom of the Brazilian rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*, is also a peptic modulator of  $Na^+$  channels and its suggested mechanism is to prevent the transition of the channels from closed to inactivated state; favoring the transition to the open state (Matavel et al. 1998). Toyama et al. (2000) used it as a valuable tool for studying the physiological role of  $Na^+$  channels in insulin secretion. Using a two-step purification process of the venom, combined with gel filtration and RP-HPLC, two toxin isoforms (F2 and F3) were obtained in the fraction classically described as a unique, 4.9 kDa, 42 amino acid residue-long basic polypeptide (Laure 1975). Out of these toxin isoforms, only F2 increased insulin secretion at an external glucose concentration of 16.7 mM.

The scorpion  $\alpha$ -neurotoxins also modulate  $Na^+$  channel inactivation. They have been described as enhancers of beta-cell depolarization and glucose-induced insulin secretion in isolated islets. Particularly, a 5.6  $\mu$ g/ml concentration of TsTx-V from *Tityus serrulatus*, induces a twofold increase of insulin secretion measured by radioimmunoassay, in the presence of 8.3 mM glucose (Gonçalves et al. 2003). This effect is evident because a 25% increase was registered in the active phase, during beta-cell oscillatory electrical activity due to toxin application. This effect is similar to that of veratridine (110  $\mu$ M), an steroid alkaloid isolated from lilaceous plants which causes a persistent activation of voltage-gated  $Na^+$  channels by slowing or even abolishing inactivation, and further depolarizing beta-cell plasma membrane (Pace 1979). Gonçalves et al. have also demonstrated the involvement of  $Na^+$  channels in insulin secretion, and pointed out to the possible use of these channels as useful targets for pharmacological interventions aimed to treating insulin secretion disorders.

### Toxins Affecting Insulin Secretion Through Voltage-Gated Calcium Channels

Calcium channels are essential for the correct function of the insulin secretion machinery since they trigger the exocytic pathway. L-type channels constitute the most important component in almost every beta-cell model, including cell lines from different species. However, calcium channel subtypes vary in abundance and importance depending on the cell type. Electrophysiological

identification and isolation of these minor fractions is a hard task to achieve, because of their low expression levels in the plasma membrane and due to the fact that their kinetics and voltage dependence overlap with those of other types of currents. Nevertheless, specific modulators are able to bypass this handicap.

In rat insulinoma cells RINm5F, after incubation with and specific binding of radiolabelled  $\omega$ -conotoxin (a toxin isolated from cone snails), a minor fraction (15–25%) of high voltage activated calcium channels was identified by electrophysiology. Those  $\omega$ -conotoxin-sensitive channels corresponded to N-type calcium channels, a common class of presynaptic proteins in the nervous system and which had not been described in insulin-secreting cells (Aicardi et al. 1991). Moreover, this toxin (0.3  $\mu$ M) decreased insulin secretion by one half when stimulated with D-glyceraldehyde and around a third when stimulated with alanine or KCl (Sher et al. 1992) rendering this specific N-type channel blocker as useful in the study of the composition and physiology of voltage-gated calcium channels in insulin-secreting cells.

In human beta cells, N-type channels seem to exert a negligible contribution to calcium influx as  $\omega$ -conotoxin GVIA (0.1  $\mu$ M), causes an average inhibition of only a 5% of the peak current and a 3% inhibition of total carried charge. Moreover, the toxin does not affect insulin secretion neither at basal nor at stimulating glucose concentrations (Braun et al. 2008). In the same paper, authors demonstrated that although L-type channels account for almost 50% of the calcium peak current, and thus for beta-cell electrical activity. P/Q-type channels contribute most to  $\text{Ca}^{2+}$  entry and exocytosis, as evidenced from the 80% reduction in insulin secretion due to the use of 0.2  $\mu$ M  $\omega$ -agatoxin (P/Q-type channel blocking peptide derived from spider venom) compared to a 31% reduction in insulin secretion by 10  $\mu$ M isradipine, an L-type calcium channel blocker.

### Toxins Affecting Insulin Secretion Through Voltage-Gated Potassium Channels and Ion Channels Determining Beta-Cell Membrane Resting Potential

Ionic currents through  $\text{K}^+$  channels are responsible for spike repolarization during the active phase in response to an external glucose rise. In rodents and humans, the voltage-dependent  $\text{Kv}2.1/2.2$  and BK channels exert the most important contribution (Hiriart and Aguilar-Bryan 2008) and thus their inhibition is expected to cause an increment in insulin release.

$\text{Kv}$  channels are blocked by 1  $\mu$ M of Hanatoxin (HaTx), a peptide toxin isolated from the tarantula *Grammostola spatulata*—former *Phrixotrichus spatulata*—(Swartz and MacKinnon 1995), which induces  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations in human pancreatic islets at 20 mM glucose, as predicted by

a dynamic model of beta-cell excitability (Tamarina et al. 2005). Toxins like this could help understand the involvement of ion channels in insulin secretion and also to explore the biophysical properties of those molecules, such as their subunit composition in beta cells (Herrington 2007). In fact, HaTx was useful to identify the major component of the delayed rectifying current of human  $\beta$ -cells, as its application at a concentration of 100 nM decreased in a 65% the  $\text{Kv}$  peak current. Moreover, the application of scorpion  $\text{Kv}1$  blockers such as margotoxin (from *Centruroides margaritatus*), kaliotoxin (*Androctonus mauretanicus mauretanicus*), and agitoxin (*Leiurus quinquestriatus herbraeus*), and also ShK from the caribbean cnidarian *Stygodactyla helianthus* (Castañeda et al. 1995), a potent  $\text{Kv}1.3$  and  $\text{Kv}3.2$  blocker, showed no effects on beta-cell  $\text{Kv}$ -channel activity, confirming previous evidences of no contribution of those channel subtypes to the delayed rectifying currents (Herrington et al. 2005).

From other spider venom (*Plesiophrictus guangxiensis*), another gating-modifier peptide named guangxitoxin was isolated and then synthesized to yield a product with the same kinetics as those of the native toxin. This toxin causes a rightward shift in the voltage dependence of  $\text{Kv}2.1$  channel activation and shows high specificity for  $\text{Kv}2$  channels. Like other gating-modifiers from tarantulas, it acts upon  $\text{Kv}4$  too, but with an eightfold decreased potency, which makes it an appropriate tool for studying  $\text{Kv}2$  channels in beta-cell physiology (Herrington et al. 2006). The isoform  $\text{GxTx-1E}$  increases the spike duration and also the firing frequency of intracellular calcium oscillation enhancing insulin secretion in a glucose-dependent manner, when applied in the micromolar range.

Recently, another three toxins from the Chinese tarantula *Chilobrachys jingzhao* have been described. These toxins shift the activation of  $\text{Kv}2.1$  channels to more depolarized voltages than the above mentioned gating-modifiers can achieve, and thus will help to elucidate the physiological role of such channels in beta cells (Yuan et al. 2007). Many tarantulas produce  $\text{Kv}$  gating-modifier toxins that are analogous to BDS and APTx from marine cnidarians *Anemonia sulcata* and *Anthopleura elegantissima*, respectively. One of their effects is to induce an apparent speeding of channel closing (reviewed by Swartz 2007).

When specific  $\text{Kv}2.1/2.2$  and A-type K current blockers like the spider venom stromatoxin, are applied to human pancreatic islets, no significant effects upon electrical activity or secretion can be observed. However, iberiotoxin (a scorpion toxin which blocks large-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels), promotes insulin secretion due to an increased spike amplitude, an effect which is unequivocally reproduced but just in the presence of tolbutamide that closes  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channels (Braun et al. 2008). The answer to this apparent contradiction could result from the



activation of  $K_{ATP}$  channels by iberiotoxin that would hyperpolarize the membrane, effect that is blocked by tolbutamide.

Other channels contributing to membrane potential in beta cells are some members from the family of transient receptor potential (TRP) channels, which elicit a nonspecific cationic current that causes an initial depolarization after  $K_{ATP}$  closure. Some pain-related TRP channels like the vanilloid-receptor-like 1 (TRPV1) are sensitive to mechanical, thermal, and chemical stimuli and capsaicin (reviewed by Salazar et al. 2009). This bioactive compound is contained in the plants of the genus *Capsicum*, or chili peppers.

TRPV1 presence has been described in rat beta cells, and increase insulin secretion has been shown when capsaicin in low concentrations ( $10^{-11}$  to  $10^{-9}$  M) is applied to RINm5F cells and to elevate plasma insulin levels when administered subcutaneously at 10 mg/kg in fasted rats (Akiba et al. 2004). TRPV1 channel is also activated by vanilloxins, peptidic toxins isolated from the West Indies tarantula *Psalmpoews cambridgei* and by the crude extract of venom from the tarantula *Ornithoctonus huwena*, which increases calcium influx through TRPV1 expressing HEK-293 cells (Siemens et al. 2006).

It is worth noting that the main scope in the study of plant and animal toxins is to determine how they affect the activity of this ion channel and the role of this protein in painful processes (Cromer and McIntyre 2008). Recently, Cuyper et al. (2006) demonstrated a capsaicin anti-desensitizing activity in crude extract of various cnidarians venoms that are associated with the typical persistent burning-pain sensation after cnidarians stings, considering the role of such channels in nociception. Interestingly, Andreev et al. (2008) have isolated from the sea anemone *Heteractis crispa* venom a novel polypeptide, named APHC1, which acts as a partial antagonist of TRPV1.

It is interesting to note a communication by Alevizos et al. (2007) where authors comment on the contradictory evidence with respect to the metabolic effects of capsaicin, since most of the literature agrees with a potentiated insulin response except for a report of attenuated postprandial hyperinsulinemia due to regular consumption of chili. The authors note the heterogeneous conditions used in the analyzed studies and argue about the possible use of capsaicin analogues as drugs for the treatment of metabolic disorders such as diabetes mellitus.

### Toxins Affecting Transducers and Second Messenger Pathways

Beta-cell physiology is subject to endogenous modulation through guanine nucleotide-binding protein coupled receptors (GPCR) acting on paracrine and endocrine regulation of insulin secretion by a large number of islet,

adrenal and enteric hormones, and also by neurotransmitters from both branches of the nervous autonomous system. Nevertheless, there are various exogenous compounds that also interact with such receptors.

Many of these insulinotropic toxins are reviewed elsewhere (Holz et al. 2000), but some of them are worth mentioning here since they are representative of quite different pathways of GPCR modulation. Pertussis toxin (PT), from the bacteria *Bordetella pertussis*, is one of the most studied toxins because its mechanisms mainly involve the inactivation of inhibitory G proteins ( $G_i$ ) from  $\alpha_2$ -adrenergic receptors and thus it promotes an indirect activation of cAMP production. However, experiments carried on isolated rat pancreas after animals were pretreated with the toxin showed a remaining effect of adrenergic stimulation, indicating that adrenergic inhibition of insulin secretion in vivo presents a PT-insensitive pathway (Hillaire-Buys et al. 1992). The effect of PT has been studied to determine the functional status of  $G_i$  protein in pancreatic islets from obese Zucker rats and although hyperinsulinemia does not seem to be related with a total loss of function of such proteins, there was a decreased ability to respond to PT with respect to lean rats, suggesting subtle alterations in obese-cell physiology (Cawthorn and Chan 1991).

Catecholaminergic stimulation, another glucose-induced endogenous inhibitor of insulin secretion, involves the activation of G protein-gated inwardly rectifying  $K^+$  potassium channels (GIRK), whose four subtypes are expressed in mice  $\beta$ -cells, and which hyperpolarizing adrenaline-induced currents are reversibly inhibited by 100 nM of the honey bee (*Apis mellifera*) toxin tertiapin-Q (Iwanir and Reuveny 2008). However, there is a possibility of certain degree of inhibition of the big conductance  $Ca^{2+}$ -dependent  $K^+$  channels, since the toxin also blocks them in a use, concentration and voltage-dependent fashion (Kanjhan et al. 2005).

The effects of xanthine derivatives upon  $Ca^{2+}$  oscillations induced by glucose mediated mobilization of intracellular  $Ca^{2+}$  has also been studied. Roe et al. (1993) found a differential action of 5 mM caffeine and theophylline on intracellular  $Ca^{2+}$ , determining a transient release at 2 mM glucose after rapid exposures (less than 2 s) and a slow increment during sustained incubation with the compounds. Nevertheless, they did not report an effect of 10  $\mu$ M ryanodine, a contradictory result to that reported by Takasawa et al. (1993), where the authors employed a tenfold concentration of ryanodine (100  $\mu$ M), a concentration at which it induced  $Ca^{2+}$  release from islet microsomes. Although caffeine does not affect membrane potential at low glucose, it induces an augmentation of electrical spike activity, and thus an elevation of intracellular calcium, when glucose rises up to 12 mM (Worley et al. 1994).

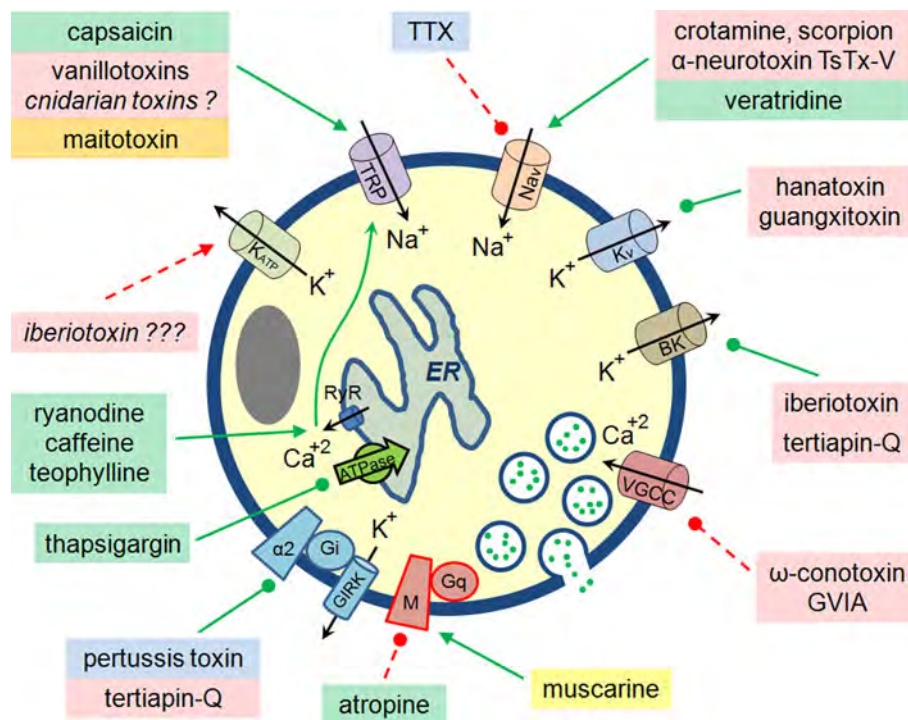
Another plant derived compound, thapsigargin, depletes intracellular calcium stores by inhibition of microsomal

$\text{Ca}^{2+}$  ATPases and, when applied at 200 nM it increases insulin secretion by 2.5-fold in isolated rat beta cells, as evidenced by a RHPA at 15.6 and 5.6 mM glucose concentrations; by an increase of 18 and 34% in the percentage of insulin-secreting beta cells, respectively. Even at zero glucose, individual cells increased their secretion by 126%, indicating a glucose-independent mechanism for thapsigargin effect (Cruz-Cruz et al. 2005).

The enhanced insulin release results from a thapsigargin-activated nonselective cationic current, mainly of  $\text{Na}^+$ , that induces a slow depolarization to a plateau level with superimposed action potentials, favoring  $\text{Ca}^{2+}$  entrance and exocytosis. This phenomenon resembles the calcium release-activated nonselective cation current ( $I_{\text{CRAN}}$ ) elicited by direct stimulation at the picomolar range with the dinoflagellate (*Gambierdiscus toxicus*) derived maitotoxin (Worley et al. 1994; Roe et al. 1998). This toxin has been proposed to share the same target of stimulation of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide (PACAP) through coupling of GTP-binding proteins, adenylyl cyclase activation and further elevation in cytoplasmic cAMP (Leech and Habener 1997).

Amongst the compounds that lead to increased intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  and finally insulin granule exocytosis, there is  $\alpha$ -latrotoxin, a protein isolated from the black widow spider *Latrodectus tredecimguttatus*, which has two peculiarities: to form presynaptically  $\text{Ca}^{2+}$  permeable pores by oligomerization and also to possess two exendin-4-like domains, characteristic of the Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) related family of hormones that increase insulin secretion (Holz and Habener 1998). The insertion of the oligomers in biological membranes requires of some receptors like neuexin, latrophilin, and protein-tyrosine-phosphatase  $\sigma$  (Hlubek et al. 2000; Ushkaryov et al. 2008; Krasnoperov et al. 2002). These proteins may also increase exocytosis by different mechanisms. In beta cells and other insulin-secreting cell lines, the GPCR latrophilin mediates a  $\text{Ca}^{2+}$ -independent potentiation of insulin release by  $\alpha$ -latrotoxin, which could be reversed by epinephrine (Lang et al. 1998).

The effects of muscarinic agonists of acetylcholine receptors on single beta cells are dependent depend on the extracellular glucose concentration. At low glucose, carbachol increases insulin secretion; while at stimulating glucose concentrations (15.6 and 20.6 mM) an inhibitory effect is



**Fig. 2** Diversity of natural modulators of ion channels involved in insulin secretion. The scheme summarizes the mechanism by which the described toxins modulate insulin secretion through actions on ion channels. *Solid and dashed lines (green and red in the online version) represent a positive or negative effect on insulin release, respectively. Arrowheads denote activation of ion channels while oval endings depict inhibition or blockade. To illustrate the diversity of sources*

from where bioactive compounds are derived, their names are accompanied by a bracket enclosed letter according to the taxa of its venom producing organisms. *Letter A (light red in the online version) symbolizes kingdom Animalia, P (green in the online version) Plantae, F (yellow in the online version) Fungi, R (orange in the online version) Protista, and M (blue in the online version) Monera*

observed. These effects are reverted by atropine, an alkaloid toxin from solanaceous plants that acts as an antagonist of muscarinic receptors (Hiriart and Ramirez-Medeles 1993). Natural compounds have proved to be very useful for basic research and also for pharmacological treatments involving these receptors, since the agonist muscarine is an alkaloid too, obtained from *Amanita muscaria*.

### Final Remarks and Perspectives

Kv channels are an attractive target for the treatment of type-2 diabetes (Herrington et al. 2006), because their blockers increase the duration of glucose-induced action potentials and augment insulin release.

The ability to synthesize toxins provides us with a readily available source of blockers and minimizes the ecological impact of collecting them from its natural sources. Nevertheless, there are some major issues to be considered, as the expression efficiency of and recombinant peptide folding. Moreover, the stability of compounds after administration should be examined during their development as therapeutic candidates.

The finding of more specific modulators of beta-cell ionic channels is still a promising field because they can be applied in basic research and for its potential role in therapeutics. There is a large diversity of venomous organisms already known to modulate insulin secretion but there is a great number of unexplored poisonous species to search for novel toxins, including almost an entire phylum where molecules acting on early or late stages of the ionic phase of insulin secretion have not been identified (Fig. 2).

The use of peptidic toxins, for instance, has been highlighted in studies focusing on ion channel structure and function relationships taking into account their potency and selectivity (Dutertre and Lewis 2010). It is important to mention that selectivity in the action of many toxins could avoid side effects and provide additional advantages, like enhancing glucose-induced insulin release, without inducing pain in type-2 diabetic patients, when treated with specific Nav1.6 agonists. It would also be desirable to achieve reduced insulin secretion and pain relief in patients with insulinoma being treated with Nav1.7 blockers, as the latter are considered analgesics (Braun et al. 2008).

**Acknowledgments** We are grateful to, Dr. Tamara Rosenbaum for reading and discussing the manuscript. To Ana María Escalante Gonzalbo and Francisco Pérez Eugenio, from the Computer Unit and Felix Sierra, for excellent technical support. All from the Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM. This work was supported by Gobierno del Distrito Federal PICDS08-72, CONACYT FI 60065, DGAPA-PAPIIT 229407, and SDI.PTID. 05.6 Facultad de Medicina Universidad Nacional Autónoma de México. Carlos Manlio Díaz García received scholar grants from Doctorado Conjunto en Ciencias Biológicas UNAM-UH, Red de

Macro Universidades de América Latina y el Caribe and Gobierno del Distrito Federal PICDS08-72.

### References

- Aicardi G, Pollo A, Sher E, Carbone E (1991) Noradrenergic inhibition and voltage-dependent facilitation of omega-conotoxin-sensitive Ca channels in insulin-secreting RINm5F cells. *FEBS Lett* 281:201–204
- Akiba Y, Kato S, Katsube K, Nakamura M, Takeuchi K, Ishii H, Hibi T (2004) Transient receptor potential vanilloid subfamily 1 expressed in pancreatic islet beta cells modulates insulin secretion in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 321:219–225
- Alevizos A, Mihas C, Mariolis A (2007) Insulin secretion and capsaicin. *Am J Clin Nutr* 85:1165–1166
- Andreev YA, Kozlov SA, Koshelev SG, Ivanova EA, Monastyrnaya MM, Kozlovskaya EP, Grishin EV (2008) Analgesic compound from sea anemone *Heteractis crispata* is the first polypeptide inhibitor of vanilloid receptor 1 (TRPV1). *J Biol Chem* 283:23914–23921
- Braun M, Ramracheya R, Bengtsson M, Zhang Q, Karanaukaite J, Partridge C, Johnson PR, Rorsman P (2008) Voltage-gated ion channels in human pancreatic beta-cells: electrophysiological characterization and role in insulin secretion. *Diabetes* 57:1618–1628
- Castañeda O, Sotolongo V, Amor AM, Stöcklin R, Anderson AJ, Harvey AL, Engström A, Wernstedt C, Karlsson E (1995) Characterization of a potassium channel toxin from the Caribbean Sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon* 33:603–613
- Cawthorn EG, Chan CB (1991) Effect of pertussis toxin on islet insulin secretion in obese (fa/fa) Zucker rats. *Mol Cell Endocrinol* 75:197–204
- Cromer BA, McIntyre P (2008) Painful toxins acting at TRPV1. *Toxicon* 51:163–173
- Cruz-Cruz R, Salgado A, Sánchez-Soto C, Vaca L, Hiriart M (2005) Thapsigargin-sensitive cationic current leads to membrane depolarization, calcium entry, and insulin secretion in rat pancreatic beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289:E439–E445
- Cuypers E, Yanagihara A, Karlsson E, Tytgat J (2006) Jellyfish and other cnidarian envenomations cause pain by affecting TRPV1 channels. *FEBS Lett* 580:5728–5732
- Dutertre S, Lewis RJ (2010) Use of venom peptides to probe ion channel structure and function. *J Biol Chem* 285:13315–13320
- Ernst SJ, Aguilar-Bryan L, Noebels JL (2009) Sodium channel beta1 regulatory subunit deficiency reduces pancreatic islet glucose-stimulated insulin and glucagon secretion. *Endocrinology* 150:1132–1139
- Gonçalves AA, Toyama MH, Carneiro EM, Marangoni S, Arantes EC, Giglio JR, Boschero AC (2003) Participation of Na(+) channels in the potentiation by *Tityus serrulatus* alpha-toxin TsTx-V of glucose-induced electrical activity and insulin secretion in rodent islet beta-cells. *Toxicon* 41:1039–1045
- Herrington J (2007) Gating modifier peptides as probes of pancreatic beta-cell physiology. *Toxicon* 49:231–238
- Herrington J, Sanchez M, Wunderler D, Yan L, Bugianesi RM, Dick IE, Clark SA, Brochu RM, Priest BT, Kohler MG, McManus OB (2005) Biophysical and pharmacological properties of the voltage-gated potassium current of human pancreatic beta-cells. *J Physiol* 567:159–175
- Herrington J, Zhou YP, Bugianesi RM, Dulski PM, Feng Y, Warren VA, Smith MM, Kohler MG, Garsky VM, Sanchez M, Wagner M, Raphaelli K, Banerjee P, Ahaghotu C, Wunderler D, Priest

- BT, Mehl JT, Garcia ML, McManus OB, Kaczorowski GJ, Slaughter RS (2006) Blockers of the delayed-rectifier potassium current in pancreatic beta-cells enhance glucose-dependent insulin secretion. *Diabetes* 55:1034–1042
- Hillaire-Buys D, Gross R, Roye M, Ribes G, Loubatières-Mariani MM (1992) Adrenergic inhibition of insulin secretion involves pertussis toxin-sensitive and -insensitive mechanisms. *Eur J Pharmacol* 218:359–362
- Hiriart M, Aguilar-Bryan L (2008) Channel regulation of glucose sensing in the pancreatic beta-cell. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295:E1298–E1306
- Hiriart M, Matteson DR (1988) Na channels and two types of Ca channels in rat pancreatic B cells identified with the reverse hemolytic plaque assay. *J Gen Physiol* 91:617–639
- Hiriart M, Ramirez-Medeles MC (1993) Muscarinic modulation of insulin secretion by single pancreatic beta-cells. *Mol Cell Endocrinol* 93:63–69
- Hlubek MD, Stuenkel EL, Krasnoperov VG, Petrenko AG, Holz RW (2000) Calcium-independent receptor for  $\alpha$ -latrotoxin and neurexin 1 $\alpha$  facilitate toxin-induced channel formation: evidence that channel formation results from tethering of toxin to membrane. *Mol Pharmacol* 57:519–528
- Holz GG, Habener JF (1998) Black widow spider alpha-latrotoxin: a presynaptic neurotoxin that shares structural homology with the glucagon-like peptide-1 family of insulin secretagogic hormones. *Comp Biochem Physiol B* 21:177–184
- Holz GG, Leech CA, Habener JF (2000) Insulinotropic toxins as molecular probes for analysis of glucagon-like peptide-1 receptor-mediated signal transduction in pancreatic beta-cells. *Biochimie* 82:915–926
- Iwanir S, Reuveny E (2008) Adrenaline-induced hyperpolarization of mouse pancreatic islet cells is mediated by G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels. *Pflugers Arch* 456:1097–1108
- Kanjhan R, Coulson EJ, Adams DJ, Bellingham MC (2005) Tertiapin-Q blocks recombinant and native large conductance K<sup>+</sup> channels in a use-dependent manner. *J Pharmacol Exp Ther* 314:1353–1361
- Krasnoperov V, Bittner MA, Mo W, Buryanovsky L, Neubert TA, Holz RW, Ichtchenko K, Petrenko AG (2002) Protein-tyrosine phosphatase- $\sigma$  is a novel member of the functional family of  $\alpha$ -latrotoxin receptors. *J Biol Chem* 277:35887–35895
- Lang J, Ushkaryov Y, Grasso A, Wollheim CB (1998) Ca<sup>2+</sup>-independent insulin exocytosis induced by alpha-latrotoxin requires latrophilin a G protein-coupled receptor. *EMBO J* 17:648–657
- Laure CJ (1975) The primary structure of crotamine. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 356:213–215
- Leech CA, Habener JF (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
- Matavel AC, Ferreira-Alves DL, Beirão PS, Cruz JS (1998) Tension generation and increase in voltage-activated Na<sup>+</sup> current by crotamine. *Eur J Pharmacol* 348:167–173
- Pace CS (1979) Activation of Na channels in islet cells: metabolic and secretory effects. *Am J Physiol* 237:E130–E135
- Philipson LH, Kusnetsov A, Larson T, Zeng Y, Westermarck G (1993) Human, rodent, and canine pancreatic beta-cells express a sodium channel alpha 1-subunit related to a fetal brain isoform. *Diabetes* 42:1372–1377
- Plant TD (1988) Na<sup>+</sup> currents in cultured mouse pancreatic B-cells. *Pflugers Arch* 411:429–435
- Pressel DM, Misler S (1990) Sodium channels contribute to action potential generation in canine and human pancreatic islet B cells. *J Membr Biol* 116:273–280
- Roe MW, Lancaster ME, Mertz RJ, Worley JF III, Dukes ID (1993) Voltage-dependent intracellular calcium release from mouse islets stimulated by glucose. *J Biol Chem* 268:9953–9956
- Roe MW, Worley JF III, Quian F, Tamarina N, Mittal AA, Drayluk F, Blair RJ, Philipson LH, Dukes I (1998) 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* 273:10402–10410
- Rosenbaum T, Vidaltamayo R, Sánchez-Soto MC, Zentella A, Hiriart M (1998) Pancreatic beta cells synthesize and secrete nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci* 95:7784–7788
- Rosenbaum T, Sánchez-Soto MC, Hiriart M (2001) Nerve growth factor increases insulin secretion and barium current in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 50:1755–1762
- Salazar H, Jara-Oseguera A, Rosenbaum T (2009) The TRPV1 channel as a target for the treatment of pain. *Rev Neurol* 48:357–364
- Sher E, Biancardi E, Pollo A, Carbone E, Li G, Wollheim CB, Clementi F (1992) omega-Conotoxin-sensitive, voltage-operated Ca<sup>2+</sup> channels in insulin-secreting cells. *Eur J Pharmacol* 216:407–414
- Siemens J, Zhou S, Piskrowski R, Nikai T, Lumpkin EA, Basbaum AI, King D, Julius D (2006) Spider toxins activate the capsaicin receptor to produce inflammatory pain. *Nature* 444:208–212
- Swartz KJ (2007) Tarantula toxins interacting with voltage sensors in potassium channels. *Toxicon* 49:213–230
- Swartz KJ, MacKinnon R (1995) An inhibitor of the Kv2.1 potassium channel isolated from the venom of a Chilean tarantula. *Neuron* 15:941–949
- Takasawa S, Nata K, Yonekura H, Okamoto H (1993) Cyclic ADP-ribose in insulin secretion from pancreatic beta cells. *Science* 259:370–373
- Tamarina NA, Kuznetsov A, Fridlyand LE, Philipson LH (2005) Delayed-rectifier (KV2.1) regulation of pancreatic beta-cell calcium responses to glucose: inhibitor specificity and modeling. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289:E578–E585
- Toyama MH, Carneiro EM, Marangoni S, Barbosa RL, Corso G, Boschero AC (2000) Biochemical characterization of two crotamine isoforms isolated by a single step RP-HPLC from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom and their action on insulin secretion by pancreatic islets. *Biochim Biophys Acta* 1474:56–60
- Ushkaryov YA, Rohou A, Sugita S (2008) A-Latrotoxin and its receptors. *Handb Exp Pharmacol* 184:171–206
- Worley JF III, McIntyre MS, Spencer B, Dukes ID (1994) Depletion of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores activates a maitotoxin-sensitive nonselective cationic current in beta-cells. *J Biol Chem* 269:32055–32058
- Yuan C, Yang S, Liao Z, Liang S (2007) Effects and mechanism of Chinese tarantula toxins on the Kv2.1 potassium channels. *Biochem Biophys Res Commun* 352:799–804

## Toxins from *Physalia physalis* (Cnidaria) Raise the Intracellular Ca<sup>2+</sup> of Beta-Cells and Promote Insulin Secretion

C.M. Diaz-Garcia<sup>1,2</sup>, D. Fuentes-Silva<sup>3</sup>, C. Sanchez-Soto<sup>1</sup>, D. Domínguez-Pérez<sup>4</sup>, N. García-Delgado<sup>5</sup>, C. Varela<sup>6</sup>, G. Mendoza-Hernández<sup>7</sup>, A. Rodríguez-Romero<sup>3</sup>, O. Castaneda<sup>5</sup> and M. Hiriart<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>Department of Neural Development and Physiology. Instituto de Fisiología Celular. Universidad Nacional Autónoma de México/Circuito Ext. SN, UNAM, Coyoacán, México DF. CP 04510, México; <sup>2</sup>Posgrado en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México; <sup>3</sup>Departamento de Biomacromoléculas. Instituto de Química. Universidad Nacional Autónoma de México; <sup>4</sup>Departamento de Biología, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km 5 1/2, Santa Clara, CP 54830, Cuba; <sup>5</sup>Facultad de Biología. Universidad de La Habana/Calle 25 No. 455, Plaza de la Revolución, La Habana CP 10400, Cuba; <sup>6</sup>Acuario Nacional de Cuba/Ave. 3ra Esq. 62, Playa, La Habana CP 10400, Cuba; <sup>7</sup>Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México

**Abstract:** *Physalia physalis* is a marine cnidarian from which high molecular weight toxins with hemolytic and neurotoxic effects have been isolated. In the present work, two novel toxins, PpV9.4 and PpV19.3 were purified from *P. physalis* by bioactive guideline isolation. It involved two steps of column chromatography, gel filtration and RP-HPLC. The molecular weights were 550.7 and 4720.9 Da for PpV9.4 and PpV19.3, respectively. In the light of the Edman sequencing results, the structure of these toxins included the presence of modified amino acids. Both toxins increased the percentage of insulin secreting beta-cells and induced cytosolic Ca<sup>2+</sup> elevation. To date, this is the first report of low molecular weight toxins increasing insulin secretion purified from cnidarians, by constituting a new approach to the study of beta-cells physiology.

**Keywords:** Animal experiment, cnidarian venom, cytosolic calcium, glucose tolerance test, insulin release, ion channel, islet beta-cell, mass spectrometry, *Physalia physalis*, toxins.

### INTRODUCTION

*Physalia physalis* [1] belongs to Siphonophores, a group of highly structured colonial organisms [2]. These animals live in a pelagic habitat and they are widely distributed throughout the tropical Atlantic Ocean, with a high population density in the gulf coasts. Its defensive/prey-capturing tentacles present a battery of poisonous stinging cells called nematocytes, which are capable to launch a toxin-containing, harpoon-like structure called nematocyst Fig. (1). They present an average diameter from 10.6 to 23.5 μm with the major toxic activity associated to the smaller structures [3].

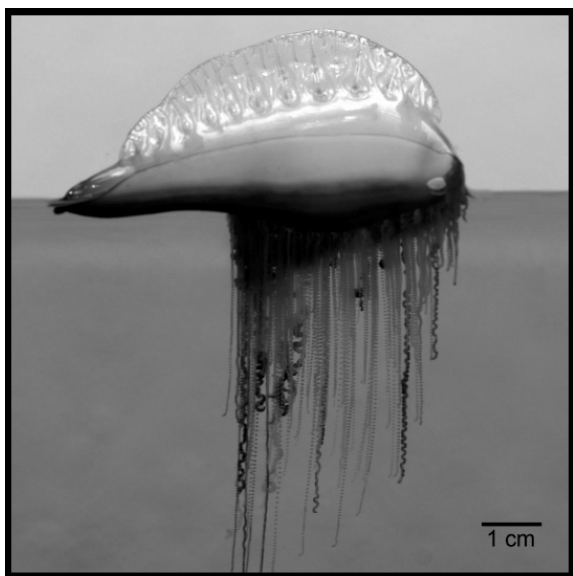


Fig. (1). A colony of *Physalia physalis*. Hanging coiled tentacles are equipped with thousands of nematocysts, containing stinging organelles with a mixture of toxins.

*Physalia physalis* envenomation has been reported for humans after accidental contact with dactylozooids (defense and prey capture tentacles), that depending on the stinging, can cause a wide range of conditions, from intense pain, nausea, vomiting, linear erythematous plaques and skin necrosis, to systemic symptoms, such as respiratory distress, impaired cardiac activity, and even death [4]. The exocytotic and cytolytic release of histamine from mast cells [5], cutaneous vasopermeability [6], and dilation of the vascular musculature of dogs and rabbits were described among the its biological effects, through a mechanism sensible to antihistamines and prostaglandin synthesis inhibitors [7, 8]. Several cases of man-of-war envenomation develop specific immunoglobulins (Ig), which have been shown to have a cross-reactive immune response with the sea nettle (*Chrysaora quinquecirrha*) toxins [9].

It has also been reported that the *P. physalis* poison increases the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> transmembranal fluxes in treating embryonic chick heart cells and many cell lines, which cannot be reverted with specific channel blockers [10, 11]. Based on the nonspecific ionic fluxes and the dose-dependent increase in the release of the enzyme lactate dehydrogenase observed in different cell lines [12], the responsible molecule could be a 240 kDa hemolytic protein [13] which represents more than one-fourth of protein content in the nematocyst [14]. Similarly, there are evidences about the neurotoxic effects of high molecular weight compounds in the venom, such as the 85 kDa toxin P<sub>3</sub>, that blocks in a reversible and dose-dependent manner the glutamatergic transmission in snail (*Zachrysis guanesis*) neurons and crayfish (*Cambarus clarkii*) neuromuscular junction [15]. Another ion channel modulator is the 200 kDa protein toxin P<sub>1</sub>, which exerts an antagonistic action against nicotinic cholinergic receptors on snail neurons and frog neuromuscular junction, but not on glutamate receptors. These evidences suggest a complex mechanism involving non-competitive antagonism and channel blockade [16].

To date, to our knowledge, there have been no published reports regarding toxins from *P. physalis* acting on the excitability of pancreatic beta-cells, which secrete insulin and play a major role in glucose homeostasis. The coupling between the elevation of the extracellular glucose concentration and insulin secretion depends on metabolic and ionic mechanisms that can be review elsewhere [17-

\*Address correspondence to this author at the Department of Neural Development and Physiology, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México/Circuito Ext. SN, UNAM, Coyoacán, México DF. CP 04510, México; Tel: 52-55-56225665; Fax: 52-55-56225747; E-mail: mhiriart@ifc.unam.mx

19]. Briefly, the sugar is carried out to beta-cells through passive glucose transporters (GLUT2 in rodents) and metabolized, which in turn increases the ATP/ADP ratio and causes the ATP sensitive  $K^+$  channels blockade. The silencing of the hyperpolarizing  $K^+$  efflux altogether the depolarizing background due to non selective cationic currents, displace the membrane potential to more positive values where significant activation of low voltage activated  $Ca^{2+}$  channel (T type) and  $Na^+$  channels occurs. The cationic influx strengthens the depolarization and unfolds the high voltage activated  $Ca^{2+}$  channels (L type mainly), which are responsible for  $Ca^{2+}$  entry which triggers insulin secretion. In the resulting oscillatory pattern of membrane potential, some voltage and  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels contribute to repolarization.

There are many compounds that affect these ion channels and they have been useful to understand the mechanisms underlying insulin secretion [20]. Some of them, for instance, the  $K^+$  channel gating modifiers peptides, have a potential application not only in the study of beta-cell physiology, but also in type 2 diabetes mellitus therapeutics [21]. The bioactive compounds isolated from cnidarians have been useful tools for biomedical research since a long time ago [22] and recently, the presence of low molecular weight compounds that modulate insulin secretion has been demonstrated [23]. However, Cnidaria is still an underexplored taxon, where only a few reports of novel products have been achieved in the class Hydrozoa (where *P. physalis* belongs) during the last decade [24].

In the present work we studied the effects of the crude tentacle-only extract from *Physalia physalis* on insulin secretion of individual native rat beta-cells. Two molecules with insulin secretion-potentiating activities were isolated and a partial biochemical characterization was carried out. These molecules (< 5 kDa) with low molecular weights induce an elevation of the cytosolic  $Ca^{2+}$ , as well as insulin secretion, by increasing hormone release by single cells and the recruitment of a secreting subpopulation of beta-cells.

## MATERIALS AND METHODS

### Sample Collection

*Physalia physalis* specimens were collected at the coast of La Habana, Cuba. The specimens were brought to the laboratory and kept in clean saline water for the preparation of the crude extract.

### Crude Extract Preparation

The crude extract was prepared by modifying a previously described method [25]. Briefly, poisonous tentacles were removed and cut in small pieces. The biological material was homogenized in ice-cold water (1:1 w/v) using a blender, alternating with five to ten periods of 5 seconds of autolysis at room temperature. The crude lysate was clarified through a layer of spun glass and subsequently centrifuged twice at 1145 g for 30 min at 4 °C. The supernatant was recovered, lyophilized and stored at -20 °C until use.

### SDS-PAGE

SDS-PAGE was performed under reducing conditions according to the method of Shagger & von Jagow [26]. The resolving gel contained 16 % polyacrylamide concentration. Proteins and peptides were stained with Coomassie R-250 Brilliant Blue for the determination of their relative molecular weight.

### Purification Procedures

Lyophilized crude extract was resuspended in 0.1 M ammonium acetate pH 6.7 to a final concentration of 2.5 mg/ml, and filtered through a 0.22  $\mu$ m Millipore membrane (Millipore, Billerica, USA). Next, aliquots were subjected to gel filtration on a HiLoad 16/20 Superdex 75 column and their elution diagrams recorded.

The column was previously equilibrated and eluted with the sample buffer (0.1 M ammonium acetate buffer pH 6.7) in an Akta FPLC System (GE Healthcare, USA) at a flow rate of 1 ml/min. The low molecular weight fractions exhibiting insulin secretion-potentiating activity were pooled and loaded onto a Phenomenex ODS-3 reverse phase column previously equilibrated with 0.1 % aqueous trifluoroacetic acid (TFA). Components were eluted using a linear gradient from 0 % to 100 % of acetonitrile containing 0.12 % TFA, at a flow rate of 1 ml/min. The protein concentration was determined by spectrophotometry using a bicinonic acid protein assay kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) with BSA as standard. Samples were read at 562 nm with a Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader (Biotek Instruments, Inc, Vermont, USA).

### Purification Table

The insulin secretion-potentiating activity of each purification step was calculated as the fraction of increase in insulin secretion at 5.6 mM (see RHPA section), divided by the volume of assay times the dilution of the toxins. The total activity was then calculated as the potentiating activity times the volume of each purification step, and the specific activity was determined dividing the total activity by the amount of sample from each step. Finally, the percentage of recovery was obtained dividing the total activity of each step by the total activity in the crude extract. Likewise, the purification factor was obtained dividing the specific activity of each purification step by the specific activity of the crude extract.

### Mass Spectrometry

Mass spectrometry of the active fraction was performed using a matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight MALDI-TOF Omnix mass spectrometer from Bruker Daltonics (Bremen, Germany) equipped with a pulsed nitrogen laser ( $\lambda = 337$  nm, 10 ns pulse width). Spectra were acquired in positive-reflection mode with a 19 kV accelerating voltage. The toxins were dissolved in a saturated solution of alpha-ciano-4-hydroxycinnamic acid in 30% acetonitrile, 0.1% trifluoroacetic acid, with Sodium-Trifluoroacetate as a catalyst for ionization. Ribonuclease (14000 Da) and Angiotensin I (1046.2 Da) were used as external standards. The toxin PpV19.3 was sent to Dr. Mary Ann Gawinowicz laboratory to determine its molecular weight at the Protein Core Facility, Columbia University College of Physicians & Surgeons.

### N-Terminal Sequencing

The N-terminal sequences of each insulinotropic toxin were determined by Edman degradation using an automatic gas-phase protein sequencer (Model LF 3000, Beckman Instruments, Irvine, USA).

### Intraperitoneal Glucose Tolerance Test

Glucose (2 g/kg body weight) was injected intraperitoneally in control (saline) and treated (*P. physalis* crude extract at 0.5, 1 and 4 mg/kg body weight) 8 weeks-old male Wistar rats. Samples were obtained via tail bleeding. Blood glucose levels were measured at 0 (before glucose injection) and 15, 30, 60, 90 and 120 min after glucose administration, using commercial blood glucose meter (Accu-Chek Active, Roche).

### Culture of Pancreatic Beta-Cells

All methods used in this study were approved by the Animal Care Committee of the Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Animal care was performed according to the "International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals", Council for International Organizations of Medical Sciences, 2010). Wistar rats were obtained from

the local animal facility, maintained in a 14:10-h light-dark cycle (0600 – 2000), and allowed free access to standard laboratory rat diet and tap water. On the day of the experiments, animals were anesthetized with intraperitoneal pentobarbital sodium (40 mg/kg), and, after pancreas dissection, animals were euthanized by cervical dislocation.

Pancreatic beta-cells were obtained by adopting the technique previously described [27]. Briefly, pancreatic islets were isolated and separated from the acinar tissue by collagenase digestion and a Ficoll gradient centrifugation; clean islets were then handpicked. Dissociation of the cells was achieved by incubating them in a shaker bath for 10 min at 37°C in calcium-free Spinner solution, with 15.6 mM glucose, 0.5% bovine serum albumin, and 0.01% trypsin, followed by mechanical disruption. Single cells were cultured for 1 day in RPMI-1640 supplemented with 10% fetal calf serum, 200 units/ml penicillin G, 200 mg/ml streptomycin, 0.5 mg/ml amphotericin B and 200 mM L-glutamine.

### Reverse Hemolytic Plaque Assay (RHPA)

To identify insulin-secreting cells, RHPA [28] was performed as described previously [29]. Briefly, after 1 day in culture, islet cells were detached from culture dishes, and equal volume of islet cells was mixed with *Staphylococcus aureus* protein A-coated sheep erythrocytes, introduced to Cunningham chambers previously treated with poly-L-lysine to promote cell attachment, and incubated for 1 hour.

Experiments were carried out at 5.6 or 15.6 mM glucose with or without each toxin in the presence of insulin antiserum, and then incubated with guinea pig complement. Insulin released was revealed by the presence of hemolytic plaques around the secreting cells, which result from the complement-mediated lysis of erythrocytes bearing insulin-anti-insulin complexes bound to protein A.

Each coverslip was scanned at a 100X or 400X magnification with a Leica Micro Dissection System 6000 (version 6.4.1.2887) coupled to a Hitachi HV-D20 camera, and the immunoplaque diameters were measured with the aid of the image analyzer software ImageJ from NIH, USA (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). The plaque size was expressed as area, and the cells that formed plaques were counted. These results were expressed as the percentage of insulin-secreting cells; at least 50 cells were counted per replicate in each experimental condition, in each culture. All experiments were performed at least three times by duplicate.

The effect of the active fraction on the overall glucose-induced secretory activity of beta-cells was also calculated as a secretion index, by multiplying the average immunoplaque area by the percentage of plaque-forming cells [30]. A frequency distribution of immunoplaque areas was constructed with the pooled data from five different experiments by duplicate, to identify functional subpopulations of beta-cells and to determine whether these subpopulations were differentially affected by the experimental treatments. According to the presence of different secreting subpopulations [31], we considered two classifications: small plaque-forming cells (SP: area of immunoplaques  $\leq 2000 \mu\text{m}^2$ ) and large plaque-forming cells (LP: area  $> 2000 \mu\text{m}^2$ ) [32, 33].

### Cell Viability

Cell viability was obtained by Trypan blue exclusion assay. Briefly, 25 000 cells were plated in 96 well microplates and incubated with 200  $\mu\text{l}$  of supplemented RPMI 1640 medium during 8 hours. Media was replaced by an equivalent solution to that used in the RHPA, by adding 50  $\mu\text{l}$  of control or treatment-containing HBSS medium to each well. Finally 0.4 % of HBSS-diluted (1:10) Trypan blue solution was added and after 3 min, blue-stained cells (dead cells) and bright living cells were counted. At least 100 cells from three random fields were analyzed and the percentage of liv-

ing cells was calculated by dividing the number of living cells by the total number of counted cells.

### Cytosolic $\text{Ca}^{2+}$ Measurement

Cells were plated in glass coverslips coated with 0.5 mg/ml Poly-L-lysine. After 24 - 48 hours of culture, cells were loaded during 30 min with 1  $\mu\text{M}$  of  $\text{Ca}^{2+}$  indicator Fluo-4AM (Molecular Probes) in Hanks Balanced Salt Solution supplemented with 200 units/ml penicillin G, 200 mg/ml streptomycin and 0.1 % BSA, washed with the same medium (3 volumes) and allowed to equilibrate for 20 min. Beta-cells were viewed through a 60x oil immersion objective and fluorescence was measured with a 488 nm excitation and 535 nm emission using a BioRad MRC 1024 microscope and the Confocal Assistant version 4.02 software. Images were acquired every 3.5 seconds for 10 minutes at 17°C. Sequence files were analyzed using the image analyzer software ImageJ from NIH, USA (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). Regions of interest were selected on the cells and the average pixel intensity was measured. The percentages of fluorescence changes ( $\Delta F/F_0$ ) were plotted as a function of time. Adjusting the exponential decay of each signal without stimulation and subtracting the curve to the recordings corrected loss of fluorescence due to photo bleaching.

### Data Analysis

Comparisons were performed by a *t-student* test using GraphPad InStat version 3.00 (GraphPad Software, San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Paired *t-student* tests were performed for RHPA experiments. Graphics were constructed using Origin version 7 (OriginLab Corporation, Northampton USA, [www.OriginLab.com](http://www.OriginLab.com)).

## RESULTS

### 2.1. SDS-PAGE Analysis of Crude Extract

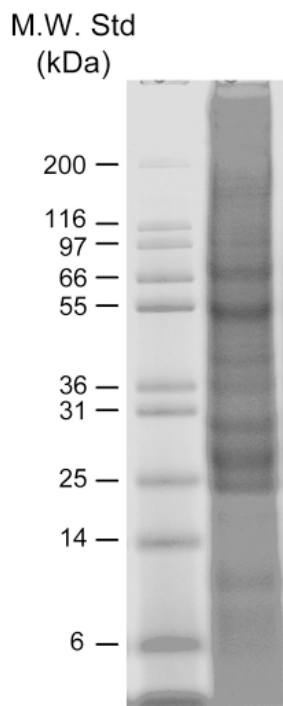
Lyophilized crude extract of *P.physalis* ( $\text{Pp}_{\text{ce}}$ ) was dissolved in 20 mM Tris-HCl pH 8.0 and then analyzed by denaturing and reducing SDS-PAGE. Staining with Coomassie Brilliant Blue R-250 revealed a complex mixture with high and low molecular weight components Fig. (2) that could be divided into three zones. A high-molecular-weight zone from 200 to 55 kDa in which two intense staining bands at 66 and 55kDa were observed. A second zone containing middle molecular weight bands corresponded to 40-25 kDa, where three closely bands migrated between 25 and 30 kDa. The third zone corresponded to the low molecular weight components, which were not well resolved in the gel and migrated as a broad and diffuse band in the range of 10 to 6 kD.

Further crude extract was used to perform an intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) and a Reverse Hemolytic Plaque Assay (RHPA) to measure its effect on insulin release of single primary rat beta-cells.

### 2.2. *Physalia physalis* Crude Extract Lowers Blood Glucose Levels *in Vivo*

*P. physalis* crude extract ( $\text{Pp}_{\text{ce}}$ ) was tested in an IPGTT at three non lethal doses of 0.5, 1 and 4 mg/kg. We observed a dose-dependent lowering effect of  $\text{Pp}_{\text{ce}}$  on blood glucose levels, which resulted in a significant 28% reduction of the area under the curve when rats were inoculated with 4 mg/kg of  $\text{Pp}_{\text{ce}}$  Fig. (3). The reducing activity of the venom on plasma glucose levels could be interpreted as an increased insulin secretion by pancreatic beta-cells and/or a higher sensitivity of target organs to the hormone. Recently, we have reported that an active fraction from *Z. sociatus* that impairs insulin release also causes glucose intolerance [23]. Therefore, we tested if the reduction of the area under the curves in the

IPGTT of Pp<sub>ce</sub> treated rats could reflect an increased insulin secretion of pancreatic beta-cells, measured by a RHPA.



**Fig. (2).** SDS-PAGE profile of the soluble proteins of *P. physalis* crude extract on a 16 % gel. Molecular weights of standard proteins are listed to the left of the gel.

### 2.3. Bioassay-Guided Purification of *Physalia physalis* Toxins

The crude extract solution was subjected to evaluation of the insulin-secretion activity on individual native rat beta-cells through a RHPA. Isolated beta-cells were incubated at 5.6 and 15.6 mM of extracellular glucose, which resemble basal and elevated glucose levels, respectively. The last mentioned to evaluate the glucose-induced insulin secretion process. *P. physalis* crude extract (500 µg/ml) augmented immunoplaque areas around secreting cells in both conditions, with an increment of 80 % in insulin secretion at 5.6 mM Fig. (4). The glucose-independent effect of the crude extract could account for the significant reduction ( $p < 0.05$ ) of blood glucose levels at 90 and 120 min of the IPGTT curve, respect to

fasting level in the 4 mg/kg treated rats. This effect can be compared to certain medicinal plants with hipoglycemic effects that increase insulin secretion at 5.6 mM glucose in an insulin-secreting cell line [34].

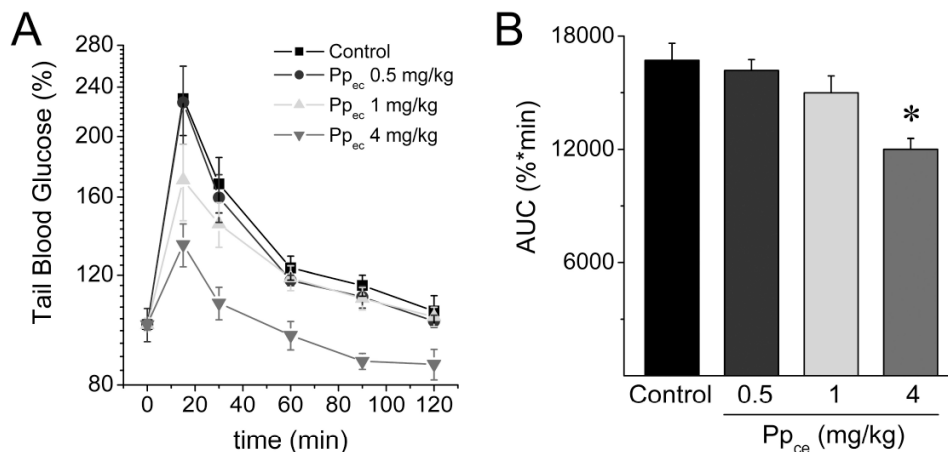
In order to isolate the active molecule(s) of the *P. physalis* crude extract, a bioassay-guided purification protocol was performed, which involved two steps of column chromatography, gel filtration and reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). Six A280 nm peak fractions, PpI, PpII, PpIII, PpIV, PpV and PpVI, were obtained through elution with 0.1 M ammonium acetate buffer pH 6.7 using gel filtration on Superdex 75 Fig. (5A). Each fraction was analyzed for insulin secretion activity. The activity was recovered in the low molecular weight fraction PpV, which exhibited a 1.76-fold increase of immunoplaque areas at basal glucose and a significant 1.18-fold increase at 15.6 mM glucose, when applied at a concentration of 300 µg/ml Fig. (5B). These effects were similar to those observed for Pp<sub>ce</sub> at a higher concentration.

The active PpV fractions were pooled and subjected to RP-HPLC on C18 column for further purification. One major peak and four minor peaks were obtained Fig. (6). The major peak was eluted with the retention time of 9.4 min and had a weak activity; while one minor peak that eluted at 19.3 min exhibited a potent activity at the same concentration. (Table 1) shows the purification parameters of the two toxins. The overall level of recovery obtained for *P. physalis* toxins was of 3 % and 12 % for PpV9.4 and PpV19.3, respectively. Both, the purification factor and the level of recovery can be considered as high, if compared with other cnidarians toxins purified by gel filtration and RP-HPLC procedures [35].

### 2.4. Toxins from *P. physalis* Increase the Overall Insulin Release by Enhancing the Average Secretion and Recruiting a Subpopulation of Secreting Beta-Cells

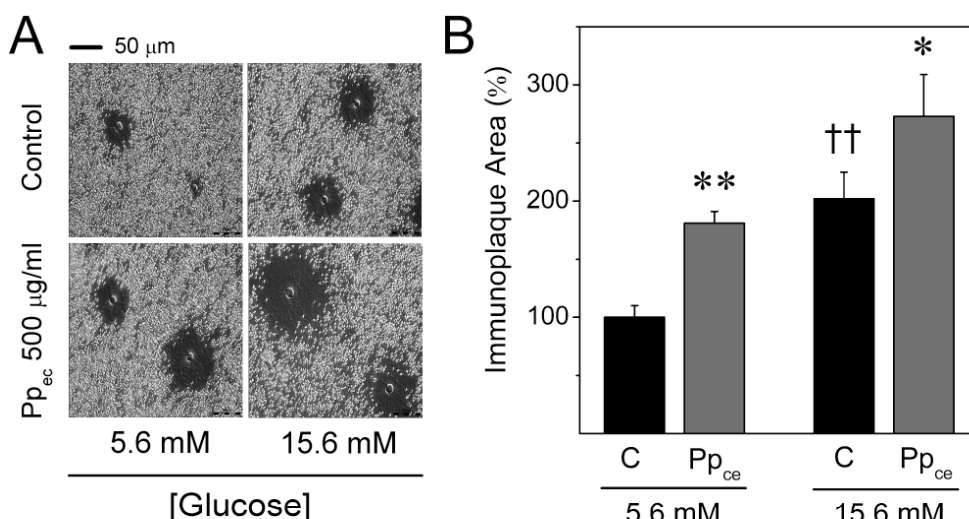
PpV9.4 did not induce a significant increase in immunoplaque areas at 60 µg/ml ( $1447 \pm 74 \mu\text{m}^2$  v.s  $1331 \pm 59 \mu\text{m}^2$  of controls,  $n = 3$ , each by duplicate), but caused a two-fold increase when applied at 130 µg/ml in an external solution containing 5.6 mM of glucose. The toxin PpV19.3 reached a similar level of activity at 60 µg/ml. Both toxins also augmented the fraction of secreting beta-cells, which resulted in a 2.4 and a 2.1-fold increases for PpV9.4 and PpV19.3, respectively, in the secretion index, a measure of the overall insulin secretion (Table 2).

From the analysis of secreting  $\beta$  cells subpopulations at 5.6 mM glucose, the recruitment of a new fraction of secreting cells by the

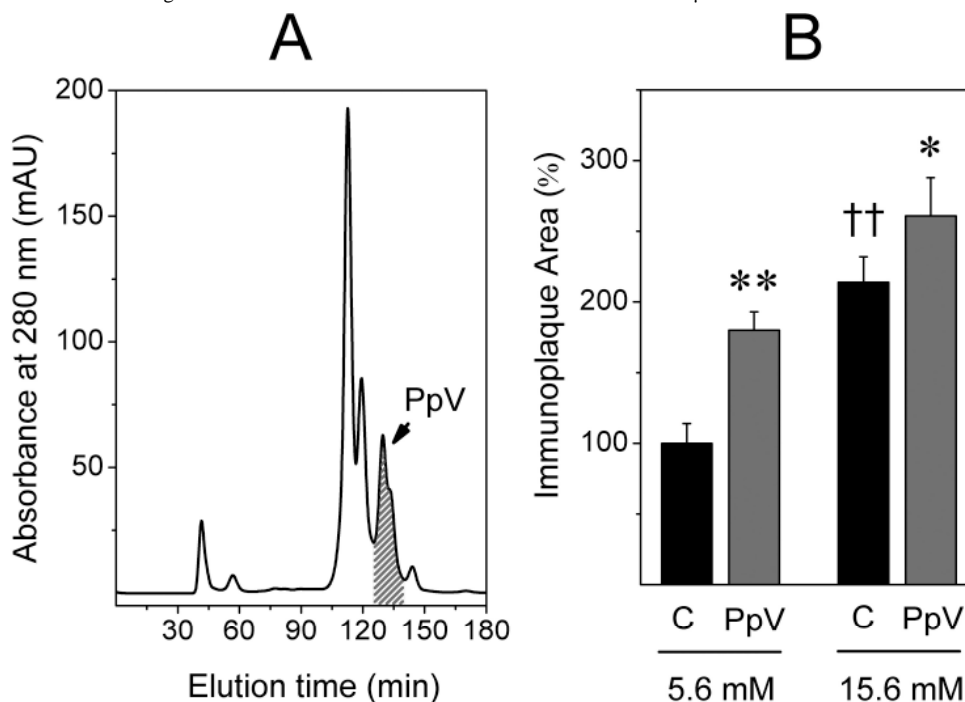


**Fig. (3).** Intraperitoneal glucose tolerance test. (a) Tolerance curves of Control ( $n = 7$ ) and *P. physalia* crude extract treated rats (Pp<sub>ce</sub>) at doses of 0.5 ( $n = 4$ ), 1 ( $n = 7$ ) and 4 mg/kg ( $n = 3$ ) show a marked reduction of glucose levels in Pp<sub>ce</sub> treated rats at the maximal dose. (b) Comparison of the areas under the curves (AUC) in each condition. At the maximal dose, Pp<sub>ce</sub> significantly reduced the AUC with a \*  $p < 0.05$ . Control blood glucose level =  $104 \pm 10$  mg/dl.





**Fig. (4).** *P. physalis* crude extract increases insulin secretion of pancreatic beta-cells. (A) Representative photomicrographs of insulin Immunoplaque Areas (IPA) measured by a Reverse Hemolytic Plaque Assay (RHPA), in each specified condition. Scale bar 50 μm. (B) Comparison among Control (C) and Pp<sub>ce</sub> (500 μg/ml) treated cells shows a significant increase in IPA at both glucose concentrations. IPA values are represented by bars, mean ± SEM of 3 different experiments by duplicate, where at least 50 cells were measured per chamber. IPAs are the dark regions around beta cells, which were formed by one hour incubation of islet cells in 5.6 mM or 15.6 mM glucose, in the presence of an insulin antibody and complement. Immunoplaque areas are directly proportional to the insulin secreted by the isolated cells. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 for comparison between control and Pp<sub>ce</sub> at the same glucose concentration. †† p < 0.01 for comparison between controls of different glucose concentrations. Control IPA at 5.6 mM = 1897 ± 192 μm<sup>2</sup>.

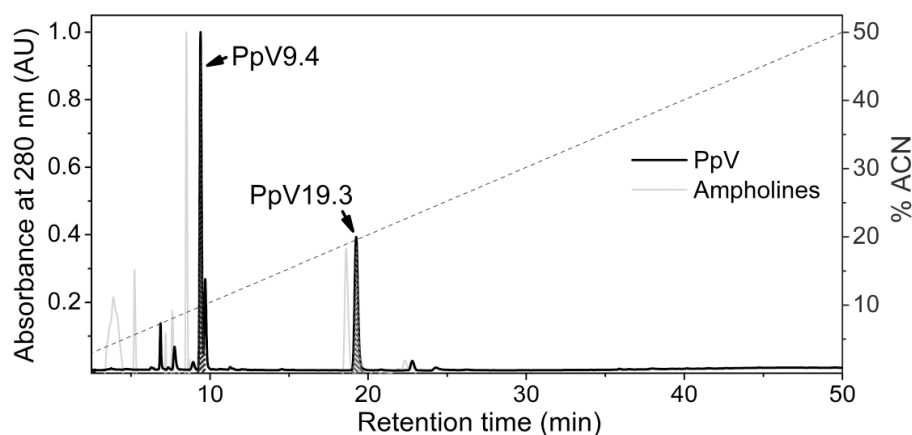


**Fig. (5).** A low molecular weight fraction from *P. physalis* crude extract potentiates insulin secretion of pancreatic beta-cells. (A) The chromatogram at 280 nm, obtained by gel filtration, shows a shaded region that represents the pooled fraction where the potentiating activity upon insulin secretion was recovered. (B) Incubation with 300 μg/ml of the active fraction (PpV) caused an increment of IPA. Bars represent mean ± SEM of 3 different experiments by duplicate, where at least 50 cells were measured per chamber. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 for comparison between control and PpV at the same glucose concentration. †† p < 0.01 for comparison between controls of different glucose concentrations. Control IPA at 5.6 mM = 1769 ± 247 μm<sup>2</sup>.

treatments with both toxins, is accompanied by a displacement of the secreting behavior of individual cells from a low rate (fraction of SP cells) to a higher degree of hormone release (LP cells). At 15.6 mM the potentiating effect relays on an increment of IPA without altering the total percentage of secreting cells Fig. (7). However, in the 130 μg/ml PpV9.4 condition, there is a significant shift from SP to LP cells.

**2.5. Low Molecular Weight Toxins from *P. physalis* Raise the Intracellular Ca<sup>2+</sup>**

The potentiating effect of the low molecular weight fraction PpV on basal secretion could not be related to the main targets of cnidarians neurotoxins: the voltage dependent ion channels [36], which significantly contribute to Ca<sup>+2</sup> influx and exocytosis in beta-cells at high glucose [17]. We explored if the active toxins could



**Fig. (6).** RP-HPLC Chromatograms of the active fraction PpV. Shaded peaks from the chromatogram at 280 nm correspond to molecules that resembled the potentiating effect on insulin secretion of isolated beta-cells. The toxins were named according to their retention times. PpV9.4 and PpV19.3 eluted within the retention times of a mixture of molecules structurally related to acylpolyamines.

**Table 1.** Scheme of Purification of the PpV9.4 and PpV19.3 Toxins from *P. physalis*

Fraction Name	Yield			Specific Activity (U/mg)	Recovery* (%)	Purification Factor* (Fold)
	Volume (ml)	Sample (mg)	Total Activity (U/ml)			
Crude extract Pp <sub>ce</sub>	80	207	92800	448	100	1
PpV	720	83	69840	841	75	1.9
PpV9.4	308	1.6	2772	1733	3	3.9
PpV19.3	881	3.1	11453	3695	12	8.2

\*Recoveries are expressed as the percentage of initial Total activity, and Purification factors are calculated on the basis of Specific activities.

**Table 2.** Toxins from *P. physalis* Potentiate the Overall Insulin Secretion by Increasing the Amount of Hormone Release and the Fraction of Secreting Cells

	IPA* ( $\mu\text{m}^2$ )		F*		SI* ( $\mu\text{m}^2$ )	
	5.6 mM	15.6 mM	5.6 mM	15.6 mM	5.6 mM	15.6 mM
Control	1704 $\pm$ 116	2903 $\pm$ 231 <sup>††</sup>	0.35 $\pm$ 0.01	0.49 $\pm$ 0.01 <sup>††</sup>	587 $\pm$ 37	1420 $\pm$ 119 <sup>††</sup>
PpV9.4	2807 $\pm$ 242**	3449 $\pm$ 212*	0.49 $\pm$ 0.02**	0.51 $\pm$ 0.03	1413 $\pm$ 207**	1766 $\pm$ 133*
PpV19.3	2795 $\pm$ 184**	3547 $\pm$ 429*	0.43 $\pm$ 0.02**	0.53 $\pm$ 0.03	1218 $\pm$ 130**	1913 $\pm$ 275*

\* Toxins PpV9.4 and PpV19.3 caused a similar potentiating effect on Immunoplaque Areas (IPA) and the total Fraction of secreting cells (F) when applied at 130  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$  respectively. The combined effects are analyzed through the Secretion Index (SI).

raise the intracellular  $\text{Ca}^{+2}$  of beta-cells at 5.6 mM glucose, in the presence of 100 nM tetrodotoxin (TTX), 300  $\mu\text{M}$   $\text{NiCl}_2$ , 10  $\mu\text{M}$  nifedipine and 100 nM  $\omega$ -conotoxin GVIA which block  $\text{Na}^+$  and type T, L and N voltage gated  $\text{Ca}^{+2}$  channels, respectively. Under these conditions, PpV9.4 (130  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) caused an immediate increment in  $\text{Ca}^{+2}$  oscillations, while PpV19.3 (60  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) rise the intracellular  $\text{Ca}^{+2}$  approximately 2 min after application Fig. (8A). The areas under the curves were integrated from the application of vehicle or toxin to the end of the 10 min recordings, which constituted a measure of the amount of  $\text{Ca}^{+2}$  ions entering the cells. Both toxins statistically increased the area under the  $\text{Ca}^{+2}$ -sensitive fluorescence curves Fig. (8B), which coincides with the increment in the basal insulin secretion.

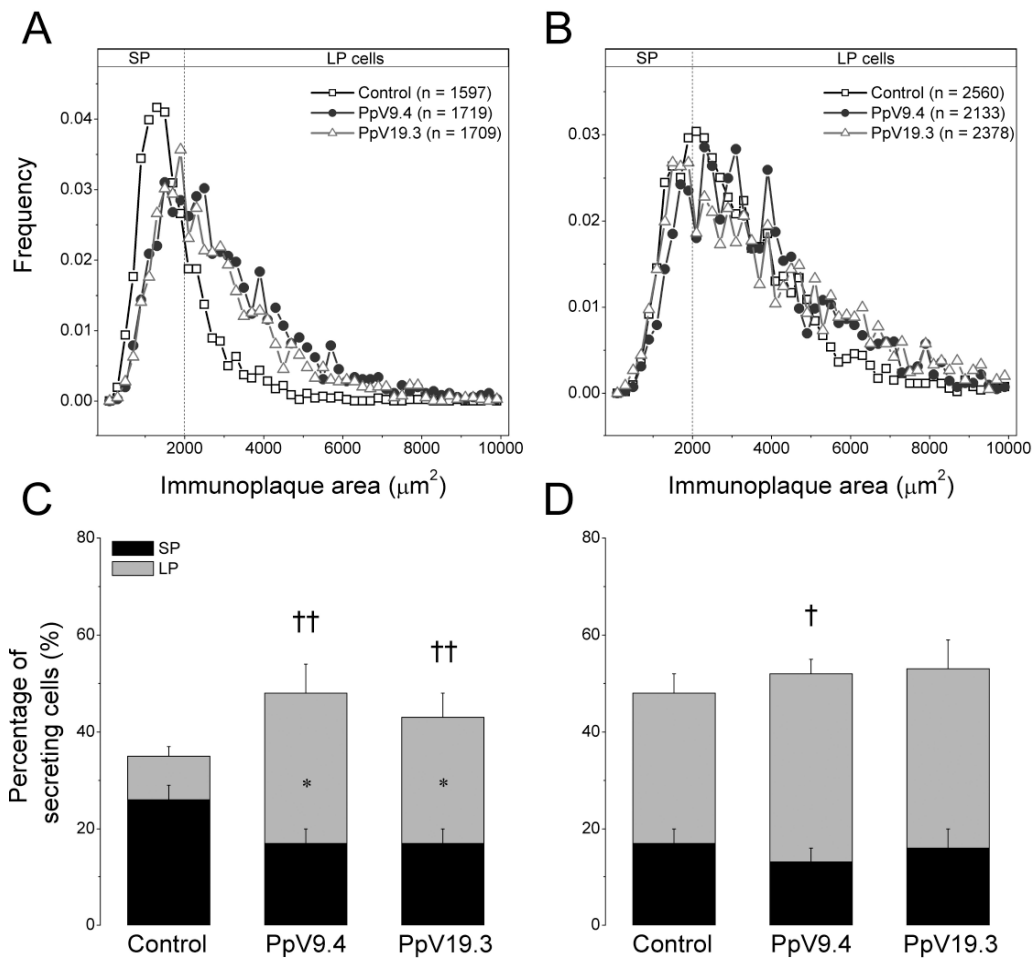
## 2.6. Biochemical Characterization of PpV9.4 and PpV19.3 Toxins

### 2.6.1. Mass Spectrometry Analysis

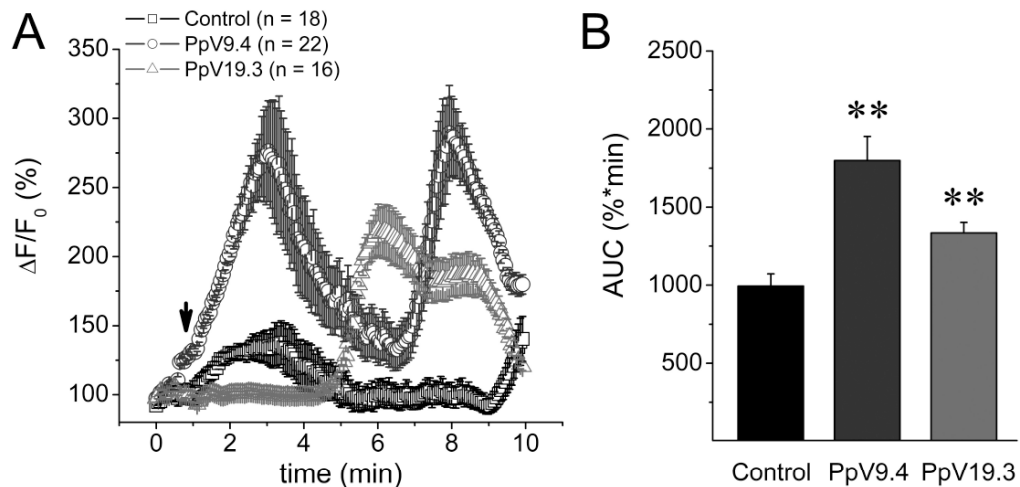
The MALDI mass spectrum of the PpV9.4 toxin showed an intense peak that appeared at  $m/z$  550.7 Da, together with two less

abundant peaks (Supplemental Fig. 1). The last fact is probably due to the presence of small amounts of the peak eluting on RP-HPLC, closely to the PpV9.4 toxin. The molecular weight of this toxin falls within the range of other bioactive compounds from the phylum, such as diterpenoids [37, 38], sesquiterpenoids [39], biscembranoids [40] and steroids [41]. Like the molecules mentioned before, PpV9.4 could be a small molecule that share hydrophobic and hydrophilic properties according to its retention time in the C18 RP-HPLC chromatogram. Thereby, it appears possible that PpV9.4 may consist of a small organic molecule or in another case to be a very short peptide. Small molecules from natural sources have a great potential in the field of drug discovery [42], especially for treating diabetes.

In contrast, the mass spectra of the second purified PpV19.3 toxin included a single peak at  $m/z$  4720.19 Da (Supplementary Fig. 1). This signal matched with the typical molecular weight range of the cnidarians peptide toxins whose masses are comprised between 3 and 7 kDa [43, 44].



**Fig. (7).** Active toxins from fraction PpV increase the percentage of secreting cells. (a, b) Histograms of Immunoplaque Areas of Control and toxin treated cells incubated at 5.6 mM and 15.6 mM glucose, respectively. Frequencies were calculated by counting the number of IPAs in 250 μm<sup>2</sup> intervals from 0 to 10000 μm<sup>2</sup>, and dividing it by the total number of cells. The cutoff value at 2000 μm<sup>2</sup> separate two distinguishable, but overlapping secreting populations of beta-cells, the small plaque (SP) and the large plaque (LP) forming plaque cells. (c, d) Percentage of SP and LP secreting cells in control and toxins treated cells at basal and high glucose respectively. Values are represented by bars, mean ± SEM of 5 different experiments with duplicate, where at least 150 cells were measured per chamber. The tested concentration for PpV9.4 and PpV19.3 toxins were 130 and 60 μg/ml, respectively. \* p < 0.05 for comparison between control and treated cells SP subpopulations; † p < 0.05 and †† p < 0.01 for comparison of LP subpopulation in the same conditions.



**Fig. (8).** *P. physalis* toxins enhance insulin secretion by increasing the intracellular Ca<sup>2+</sup> of pancreatic beta-cells. (a) Average traces of relative changes in Ca<sup>2+</sup> sensitive fluorescence of control and toxin treated cells incubated at 5.6 mM glucose. Arrow indicates the application of PpV9.4 (130 μg/ml) or PpV19.3 (60 μg/ml) to the bath solution. (b) Comparison of areas under the curves (AUC) from traces of Ca<sup>2+</sup> imaging experiments show higher rises of intracellular Ca<sup>2+</sup> from toxin treated cells. Bars represent mean ± SEM. \*\* p < 0.01 for comparison between control and toxin treated cells.

### 2.6.2. Edman Degradation and Analysis of the HCl Hydrolysis

In order to demonstrate the peptide nature of the PpV19.3 toxin and to obtain any structural information of PpV9.4 toxin, we used the automatic Edman degradation procedure to identify N-terminal residues in both toxins. As result, the analysis of the purified PpV9.4 toxin revealed one major peak eluting at a retention time of 8.62 min, near the appropriate retention time as is determined to phenylthiohydantoin (PTH)-asparagine, though the definite identification of this residue was not possible. Indeed, it is conceivable idea that this signal belongs to a new modified amino acid. On the contrary, another eluted peak identified in the sequence of PpV9.4 matched with PTH-tryptophan. In contrast, Edman degradation of PpV19.3 toxin revealed in the first two cycles the presence of PTH-tyrosine, -leucine and -tryptophan, in addition to the similar peak at 8.88 unidentified in PpV9.4 and a peak that eluted at 12.33 min, which was not matched with any PTH-residue standard. Therefore, these results strongly suggest that PpV19.3 could be a new class of marine toxin containing amino acid in its structure and showing a molecular weight characteristic of peptide toxins.

On the other hand, PpV9.4 present features consistent with the reported for acylpolyamines. The results of the amino acid sequencing for each toxin are shown in (Supplementary Fig. 2). Four cycles of Edman degradation were performed on each toxin and there was no activity observed in the third cycle of the degradation, which indicated that only two and five residues are contained into the PpV9.4 and PpV19.3 respectively. Insulin pattern was submitted to analysis by Edman degradation as control of the sequencing protein for quality assurance of our sequences determined. The sequence analysis confirmed the first four N-terminal amino acid residues of both chain A (GIVE) and chain B (FVNQ).

To corroborate the presence of the residues identified by Edman degradation in the structures of PpV9.4 and PpV19.3, the toxin samples were exhaustively hydrolyzed with HCl (3N) at 37 °C during 8 hours and then hydrolysates were analyzed by C18 RP-HPLC. Chromatogram profiles were compared with those recorded for tryptophan and tyrosine standards. As shown in (Supplementary Fig. 3), several products were released from PpV19.3 toxin, which exhibited a complex profile when compared to PpV9.4. In the hydrolysate of PpV19.3 the presence of tryptophan and tyrosine was detected, which was accordant with the result obtained by Edman degradation. However, a simple chromatography elution profile was achieved in the hydrolysate of PpV9.4, where only two major peaks were observed and any peak could not be identified with tryptophan or asparagine probably because during HCl hydrolysis asparagine is converted to aspartic acid and tryptophan is oxidized.

## DISCUSSION

Polyamine-containing toxins are ubiquitous polycationic molecules at physiological pH that modulate a variety of ionotropic receptors. They have been identified by RP-HPLC with a C18 column as the low molecular weight compounds eluting, in a linear gradient of ACN from 0 % to 60 % (v/v), between 10 and 30 min [45]. In this concern, the comparison of the retention times between the two toxins isolated from *P. physalis* and a mixture of organic molecules structurally related to acylpolyamines, at the same chromatographic conditions, shows that both toxins elute within the range of acylpolyamines. This chromatographic behavior might suggest similarities in the molecular nature of the toxins PpV9.4 and PpV19.3. Interestingly, acylpolyamines commonly occur in spider venoms and constitute a group of polar compounds usually with molecular weights below 1 kDa, that modulate ionotropic glutamate receptors as well as other neuronal ion channels [46, 47]. However, in recent years a collection of unusually long-chain polyamines (LCPAs), as well as a new family of small peptides that are post-translationally modified by the attachment of long-chain polyamines have been isolated from the marine sponge, *Axinyssa aculeate* [48, 49]. Latest

is a recent example of a novel structural feature reported for naturally occurring peptides from marine organism, which is a reach source of unusual compounds showing unexpected interactions with mammalian cells.

The ability of both toxins to elevate the cytosolic  $Ca^{2+}$  when most of the voltage gated ion channels were blocked, rise many questions about their mechanisms of action. So far, it is not likely that they act in a similar fashion; instead, we can speculate that the fast effect of PpV9.4 seems to be directly on some TRP channel or glutamate ionotropic receptor, which are permeable to  $Ca^{2+}$  and functionally relevant to insulin secreting cells [50, 51].

Interestingly, Cuypers and coworkers (2006) [52] found a sensitizing activity on the vanilloid member 1 of the Transient Receptor Potential family of ion channels (TRPV1) in a similar crude extract from *Physalia physalis*, and associated with the resulting increment in the currents with a persistent burning-pain sensation. TRPV1 is a  $Ca^{2+}$ -permeable ion channel that has been related to insulin secretion [17, 50]. It is clear that this channel is present in the sensorial fibers that innervate the pancreatic islets and participate in the modulation of insulin secretion, as well as insulin resistance and islet inflammation [53]. The presence of functional TRPV1 channels have been demonstrated in the rat insulinoma INS-1E cell line [54] and certain studies indicate that they are also present in native beta-cells, although it is still a controversial issue [55]. Several TRP channels are involved in insulin secretion, contributing to the early depolarization and also to the membrane voltage and intracellular  $Ca^{2+}$  oscillations of beta-cells [56]. These channels could be a potential target for cnidarians toxins increasing insulin secretion.

The increment of intracellular  $Ca^{2+}$  by PpV19.3, is delayed with respect to that of PpV9.4 and possibly related to slower processes, such as metabotropic receptors or G protein mediated signaling cascades which are present in beta-cells and regulate  $Ca^{2+}$  release from intracellular stores [57, 58]. It is clear that the enhanced insulin release is not a collateral effect of cytotoxicity, since none of the toxins, or the crude extract, caused a significant change in cell viability (Supplementary Fig. 4). The unraveling of the full structure and the exact mechanisms of action of both toxins is a matter of further research.

It is known that the venom from *Physalia physalis* tentacles possesses great similarity with that of the hydra, considering their high molecular weight cytolytic toxins composition and biological effects [13, 59]. However, it has also been proposed that the hydra lacks of the classical  $Na^+$  and  $K^+$  channel peptide neurotoxins of sea anemones [59, 60].

In the present study we have purified and characterized two novel low molecular weight toxins from *Physalia physalis* tentacle-only crude extract. The purified toxins have been designated according to their retention times as PpV9.4 and PpV19.3. N-terminal sequencing by Edman degradation revealed that both toxins contain amino acids found in acylpolyamines, as well as signals unidentified, which may suggest the presence of modified amino acids with new structural features, as was recently reported to *A. aculeate* [49]. For this reason, currently structural studies using the combination of MS/MS and NMR experiments are being carried out to know the two *P. physalis* toxins structures described in this work, which may represent a valuable issue in the field of the structural toxinology. In contrast, until now only cytochrome oxidase subunit-I [61], voltage-gated potassium channel (GenBank: ABD59027.1) and the beta subunit of the calcium channel (GenBank: ABD59026.1) [62], three high molecular weight proteins, are the only ones that have been reported for this specie. Therefore, this is the first report, to our knowledge, of low molecular weight toxins obtained from this specie.

The isolated *P. physalis* toxins potentiate insulin secretion by increasing the cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration. The exact mechanism

by which the toxins raise the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  is currently studied. It may be possible that some ion channels and/or signaling cascades could be affected not only in beta-cells but also in other excitable tissues, broadening the biological activities of such toxins. The anti-diabetic potential of bioactive compounds from marine sources, such as algae-derived polysaccharides with stimulatory activities on insulin secretion of RIN-5F cells, is the focus of intense research [63]. Then, the discovery of novel bioactive compounds from *P. physalis* with potentiating activity on the beta-cells at basal glucose constitutes a first approximation to obtain new approaches in the study of beta-cells physiology and it may constitute a tool for the treatment of insulin related disorders.

Our work has been conducted in beta-cells isolated from non-diabetic normoglycemic rats, which at 15.6 mM glucose almost saturate the response of insulin secretion, measured by the RHPA [30, 64]. We have not assayed the possible effect of PpV9.4 or PpV19.3 on diabetic conditions. However, in this condition the response of beta cells to glucose is altered.

The effectiveness of the toxins in pathological conditions is an interesting question that should be explored in future work, along with a pharmacological analysis of them (i.e. dose-response curves). However, it is known that for certain drugs which potentiate insulin secretion, such as blockers of  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channels; their potency varies according to the dose and the glucose levels [65]. Some of them are completely ineffective at maximal stimulating glucose concentrations [66].

## CONCLUSIONS

In conclusion, the present work shows that poisonous tentacles of *Physalia physalis* contain low molecular weight compounds with different chemical nature, which affect beta-cells excitability mainly at basal glucose, increasing the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  without a direct activation of voltage-gated channels.

## CONFLICT OF INTEREST

The author(s) confirm that this article content has no conflicts of interest.

## ACKNOWLEDGEMENTS

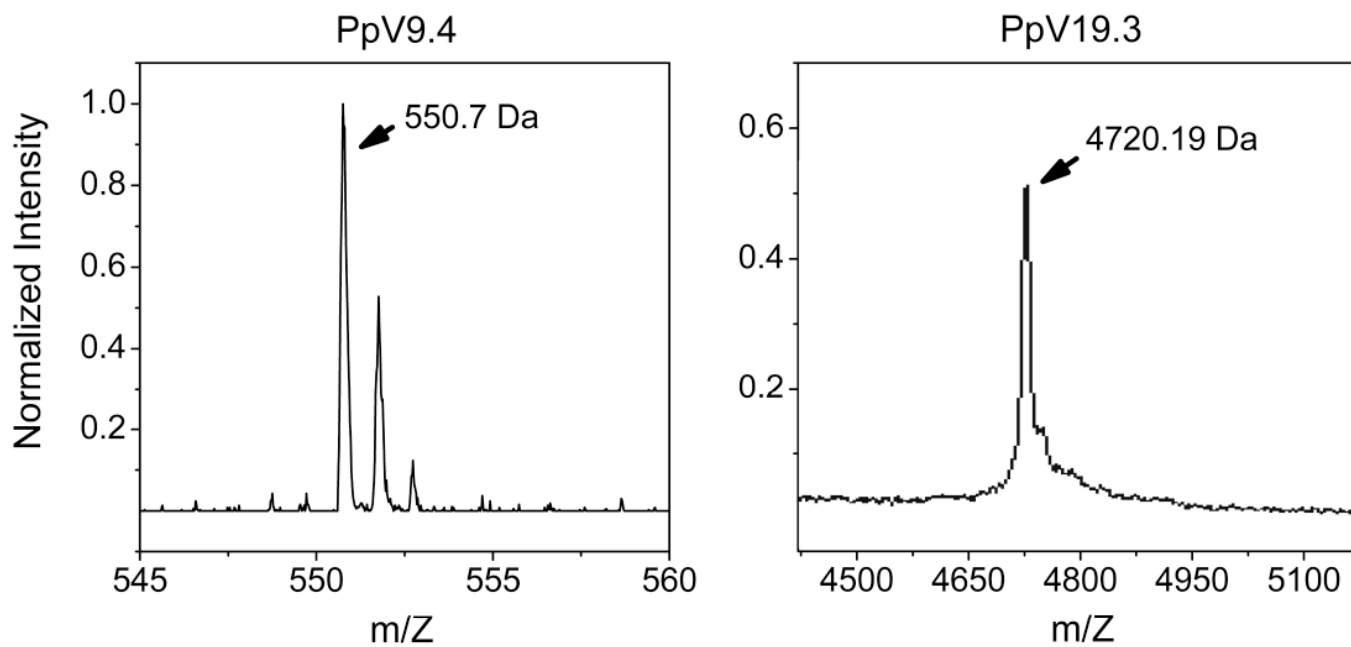
The authors are grateful to Dr. Mary Ann Gawinowicz for mass determination of PpV19.3 toxin. To Ana María Escalante Gonzalez, Francisco Pérez Eugenio and Efrén A. Robledo, from the Computer Unit to Dr. Aracely and Félix Sierra, for excellent technical support. All from the Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Also to Acela Pedrosa from Instituto de Endocrinología de Cuba for liophyllization and photographer Rafael Mesa for *P. physalis* picture. To A.S. Gandini for art work. Work in the laboratory of M. Hiriart is supported by Gobierno del Distrito Federal PICDS08-72, CONACYT CB2009-131647, and DGAPA-PAPIIT IN215611, Universidad Nacional Autónoma de México. C.M. Diaz-García is the recipient of a Doctoral Fellowship (CVU/Becario: 356396/245301) from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

## REFERENCES (AND NOTES)

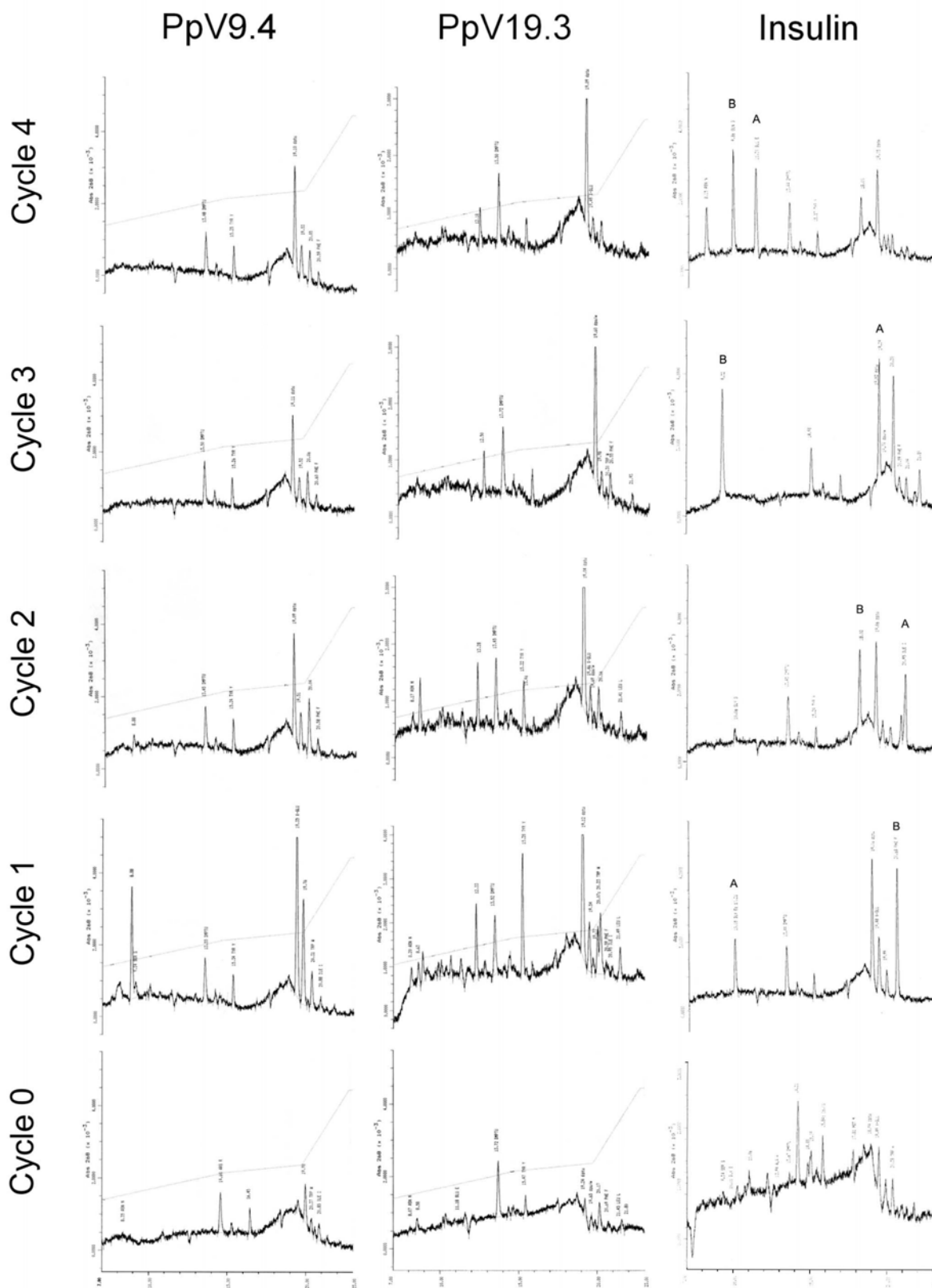
- Linnaeus, C., 1758, *Tomus I*, 1-824.
- Dunn, C. *Curr Biol*, 2009, 19, R233-4.
- Burnett, J. W.; Ordóñez, J. V.; Calton, G. J. *Toxicon*, 1986, 24, 514-8.
- Haddad, V., Jr.; da Silveira, F. L.; Cardoso, J. L.; Morandini, A. C. *Toxicon*, 2002, 40, 1445-50.
- Cormier, S. M. *J Exp Zool*, 1984, 231, 1-10.
- Burnett, J. W.; Calton, G. J. *Toxicon*, 1986, 24, 614-7.
- Loredo, J. S.; Gonzalez, R. R., Jr.; Hessinger, D. A. *J Pharmacol Exp Ther*, 1985, 232, 301-4.
- Loredo, J. S.; Gonzalez, R. R., Jr.; Hessinger, D. A. *J Pharmacol Exp Ther*, 1986, 236, 140-3.
- Russo, A. J.; Calton, G. J.; Burnett, J. W. *Toxicon*, 1983, 21, 475-80.
- Larsen, J. B.; Lane, C. E. *Comp Biochem Physiol*, 1970, 34, 333-8.
- Edwards, L.; Luo, E.; Hall, R.; Gonzalez, R. R., Jr.; Hessinger, D. A. *Toxicon*, 2000, 38, 323-35.
- Edwards, L.; Hessinger, D. A. *Toxicon*, 2000, 38, 1015-28.
- Tamkun, M. M.; Hessinger, D. A. *Biochim Biophys Acta*, 1981, 667, 87-98.
- Burnett, J. W.; Calton, G. J. *Toxicon*, 1987, 25, 581-602.
- Mas, R.; Menendez, R.; Garateix, A.; Garcia, M.; Chavez, M. *Neuroscience*, 1989, 33, 269-73.
- Menendez, R.; Mas, R.; Garateix, A.; Garcia, M.; Chavez, M. *Comp Biochem Physiol C*, 1990, 95, 63-9.
- Hiriart, M.; Aguilar-Bryan, L. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008, 295, E1298-306.
- Ashcroft, F. M.; Rorsman, P. *Prog Biophys Mol Biol*, 1989, 54, 87-143.
- Henquin, J. C.; Meissner, H. P. *Experientia*, 1984, 40, 1043-52.
- Diaz-García, C. M.; Sanchez-Soto, C.; Hiriart, M. *Cell Mol Neurobiol*, 2010, 30, 1275-81.
- Herrington, J. *Toxicon*, 2007, 49, 231-8.
- Suput, D. *Toxicon*, 2009, 54, 1190-200.
- Diaz-García, C. M.; Sanchez-Soto, C.; Fuentes-Silva, D.; Leon-Pinzon, C.; Dominguez-Perez, D.; Varela, C.; Rodriguez-Romero, A.; Castaneda, O.; Hiriart, M. *Toxicon*, 2012, 59, 306-14.
- Rocha, J.; Peixe, L.; Gomes, N. C.; Calado, R. *Mar Drugs*, 2011, 9, 1860-86.
- Gómez, T.; Romero, D. L.; Wong, L.; Barral, A. M.; Martínez, J. R.; Chávez, M. A. *Rev. Cubana Invest. Biom.*, 1986, 5, 117-125.
- Schagger, H.; von Jagow, G. *Anal Biochem*, 1987, 166, 368-79.
- Diaz-Villasenor, A.; Sanchez-Soto, M. C.; Cebrian, M. E.; Ostrosky-Wegman, P.; Hiriart, M. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2006, 214, 30-4.
- Neill, J. D.; Frawley, L. S. *Endocrinology*, 1983, 112, 1135-7.
- Aguayo-Mazzucato, C.; Sanchez-Soto, C.; Godínez-Puig, V.; Gutierrez-Ospina, G.; Hiriart, M. *PLoS One*, 2006, 1, e35.
- Hiriart, M.; Ramirez-Medeles, M. C. *Endocrinology*, 1991, 128, 3193-8.
- Hiriart, M.; Ramirez-Medeles, M. C. *Mol Cell Endocrinol*, 1993, 93, 63-9.
- Sanchez-Soto, M. C.; Larrieta, M. E.; Vidaltamayo, R.; Hiriart, M. *Diabetologia*, 1999, 42, 1086-92.
- Rosenbaum, T.; Sanchez-Soto, M. C.; Hiriart, M. *Diabetes*, 2001, 50, 1755-62.
- Hussain, Z.; Waheed, A.; Qureshi, R. A.; Burdi, D. K.; Verspohl, E. J.; Khan, N.; Hasan, M. *Phytother Res*, 2004, 18, 73-7.
- Uechi, G.; Toma, H.; Arakawa, T.; Sato, Y. *Protein J*, 2011, 30, 422-8.
- Honma, T.; Shiomi, K. *Mar Biotechnol (NY)*, 2006, 8, 1-10.
- Chen, B. W.; Chao, C. H.; Su, J. H.; Wen, Z. H.; Sung, P. J.; Sheu, J. H. *Org Biomol Chem*, 2010, 8, 2363-6.
- Chen, Y. H.; Tai, C. Y.; Su, Y. D.; Chang, Y. C.; Lu, M. C.; Weng, C. F.; Su, J. H.; Hwang, T. L.; Wu, Y. C.; Sung, P. J. *Mar Drugs*, 2011, 9, 934-43.
- Su, J. H.; Chiang, M. Y.; Wen, Z. H.; Dai, C. F.; Hsu, C. H.; Sheu, J. H. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2010, 58, 250-3.
- Yan, P.; Deng, Z.; van Ofwegen, L.; Proksch, P.; Lin, W. *Mar Drugs*, 2010, 8, 2837-48.
- Chai, X. Y.; Sun, J. F.; Tang, L. Y.; Yang, X. W.; Li, Y. Q.; Huang, H.; Zhou, X. F.; Yang, B.; Liu, Y. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2010, 58, 1391-4.
- Liu, Q.; Chen, L.; Hu, L.; Guo, Y.; Shen, X. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1799, 854-65.
- Castaneda, O.; Harvey, A. L. *Toxicon*, 2009, 54, 1119-24.
- Moran, Y.; Gordon, D.; Gurevitz, M. *Toxicon*, 2009, 54, 1089-101.
- Moore, S.; Smyth, W. F.; Gault, V. A.; O'Kane, E.; McClean, S. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2009, 23, 1747-55.
- Estrada, G.; Villegas, E.; Corzo, G. *Nat Prod Rep*, 2007, 24, 145-61.
- Scott, R. H.; Sutton, K. G.; Dolphin, A. C. *Trends Neurosci*, 1993, 16, 153-60.
- Sufrin, J. R.; Finckbeiner, S.; Oliver, C. A. *Mar Drugs*, 2009, 7, 401-34.
- Matsunaga, S.; Jimbo, M.; Gill, M. B.; Wyhe, L. L.; Murata, M.; Nonomura, K.; Swanson, G. T.; Sakai, R. *Chembiochem*, 2011, 12, 2191-200.
- Uchida, K.; Tominaga, M. *Endocr J*, 2011.
- Inagaki, N.; Kuromi, H.; Gono, T.; Okamoto, Y.; Ishida, H.; Seino, Y.; Kaneko, T.; Iwanaga, T.; Seino, S. *FASEB J*, 1995, 9, 686-91.
- Cuypers, E.; Yanagihara, A.; Karlsson, E.; Tytgat, J. *FEBS Lett*, 2006, 580, 5728-32.
- Razavi, R.; Chan, Y.; Affifyan, F. N.; Liu, X. J.; Wan, X.; Yantha, J.; Tsui, H.; Tang, L.; Tsai, S.; Santamaria, P.; Driver, J. P.; Serreze, D.; Salter, M. W.; Dorsch, H. M. *Cell*, 2006, 127, 1123-35.
- Jabin Fagelskiold, A.; Kannisto, K.; Bostrom, A.; Hadrovic, B.; Farre, C.; Eweida, M.; Wester, K.; Islam, M. S. *Islets*, 2012, 4.
- Islam, M. S. *Adv Exp Med Biol*, 2011, 704, 811-30.
- Colsoul, B.; Vennekens, R.; Nilius, B. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 2011, 161, 87-110.
- Cline, G. W.; Zhao, X.; Jakowski, A. B.; Soeller, W. C.; Treadway, J. L. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 412, 413-8.
- Oya, M.; Suzuki, H.; Watanabe, Y.; Sato, M.; Tsuboi, T. *Genes Cells*, 2011, 16, 608-16.
- Sher, D.; Zlotkin, E. *Toxicon*, 2009, 54, 1148-61.
- Oliveira, J. S.; Redaelli, E.; Zaharenko, A. J.; Cassulini, R. R.; Konno, K.; Pimenta, D. C.; Freitas, J. C.; Clare, J. J.; Wanke, E. *J Biol Chem*, 2004, 279, 33323-35.

- [61] Ortman, B. D.; Bucklin, A.; Pages, F.; Youngbluth, M. *Deep-Sea Research II*, **2010**, *57*, 2148-2156.
- [62] Bouchard, C.; Price, R. B.; Moneypenny, C. G.; Thompson, L. F.; Zillhardt, M.; Stalheim, L.; Anderson, P. A. *J Exp Biol*, **2006**, *209*, 2979-89.
- [63] Zhang, D.; Fujii, I.; Lin, C.; Ito, K.; Guan, H.; Zhao, J.; Shinohara, M.; Matsukura, M. *Biol Pharm Bull*, **2008**, *31*, 921-4.
- [64] Hiriart, M.; Martinez, M. T.; Ramirez-Medeles, M. C. *Adv Exp Med Biol*, **1997**, *426*, 267-74.
- [65] Fuhlendorff, J.; Rorsman, P.; Kofod, H.; Brand, C. L.; Rolin, B.; MacKay, P.; Shymko, R.; Carr, R. D. *Diabetes*, **1998**, *47*, 345-51.
- [66] Joost, H. G.; Hasselblatt, A. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **1979**, *306*, 185-8.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

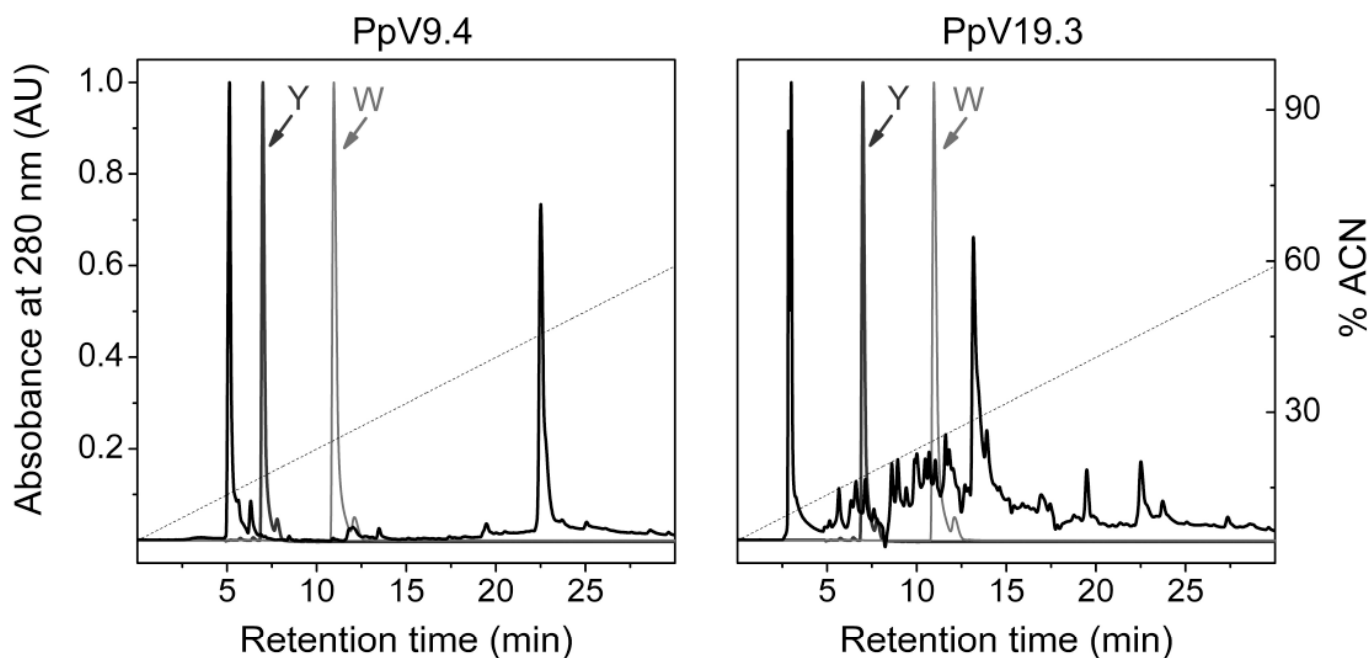


Supplementary Fig. (1). MALDI mass spectra of the purified PpV9.4 and PpV19.3 toxins from *P. physalis*.

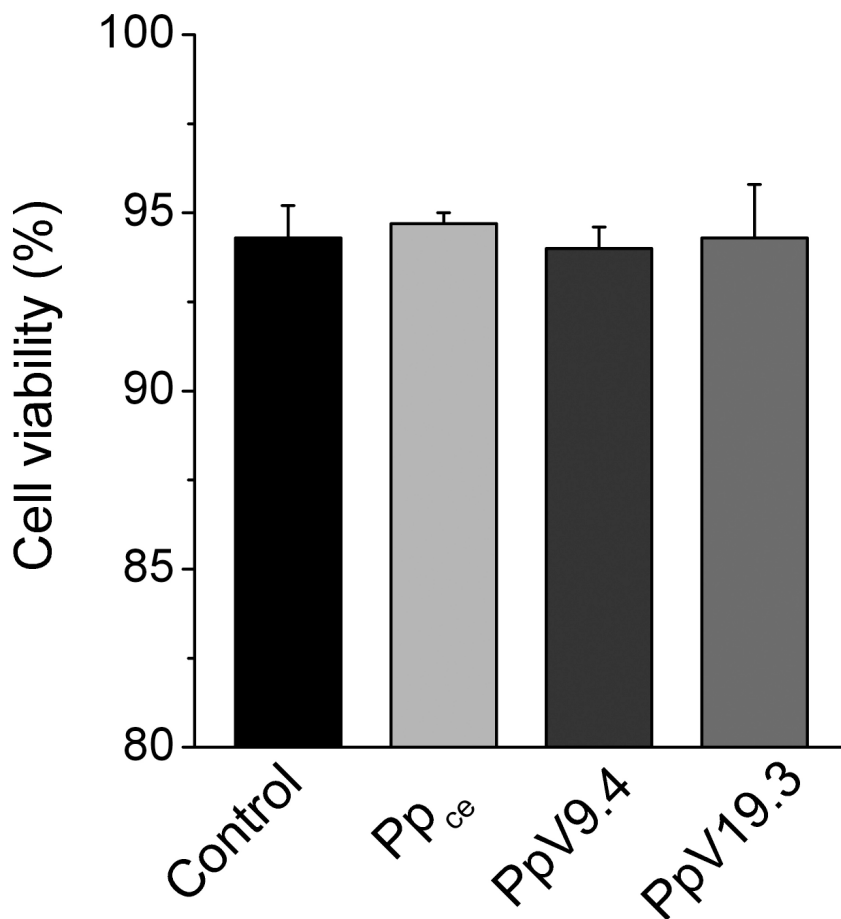


Supplementary Fig. (2). First four cycles of amino acid analysis by automatic Edman degradations of *P. physalis* toxins. Columns show the identified amino acids in PpV9.4 (left) and PpV19.3 (center) toxins, as well as N-terminal sequencing of the Insulin pattern (right).





**Supplementary Fig. (3).** RP-HPLC analysis of the hydrolysis products released from *P. physalis* toxins by acid hydrolysis. Retention times of toxin products obtained after acid hydrolysis were compared with those obtained for residue standards. Retention times of the eluted amino acid standards are identified by the single letter code Y (Tyrosine) and W (Tryptophan).



**Supplementary Fig. (4).** *P. physalis* crude extract and the purified toxins did not affect beta-cells viability. Bars represent cell viability expressed as percentage of living-cells, after the incubation in Hank's balanced salt solution (Control) or treated with *P. physalis* crude extract (Pp<sub>ce</sub>) or the low molecular weight toxins PpV9.4 and PpV19.3 in the same condition of the RHPA experiments at 5.6 mM glucose. Values are mean  $\pm$  SEM, calculated through a Trypan blue assay, where at least 100 cells were analyzed per replicate (n = 3).

# TRPM Channels Phosphorylation as a Potential Bridge Between Old Signals and Novel Regulatory Mechanisms of Insulin Secretion

Diaz-Garcia, Carlos Manlio<sup>1,2</sup>, Sanchez-Soto<sup>1</sup>, Carmen and Hiriart Marcia<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. División de Neurociencias, Departamento de Neurodesarrollo y Fisiología. Ciudad Universitaria, Circuito Ext. UNAM, Coyoacán, México DF. CP 04510, México*

<sup>2</sup>*Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM*

**Abstract:** Transient receptor potential channels, especially the members of the melastatin family (TRPM), participate in insulin secretion. Some of them are substrates for protein kinases, which are involved in several neurotransmitter, incretin and hormonal signaling cascades in  $\beta$  cells. The functional relationships between protein kinases and TRPM channels in systems of heterologous expression and native tissues rise issues about novel regulation pathways of pancreatic  $\beta$ -cell excitability. The aim of the present work is to review the evidences about phosphorylation of TRPM channels in  $\beta$  cells and to discuss the perspectives on insulin secretion.

**Keywords:** Pancreatic beta cells, insulin, phosphorylation, TRP channels.

## OVERVIEW OF INSULIN SECRETION

Pancreatic  $\beta$ -cells secrete insulin in response to increases of extracellular glucose, amino acids and other nutrients and metabolites. Glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) arises from the interaction of metabolic and ionic pathways. After glucose uptake through GLUT transporters (predominantly GLUT1 in humans and GLUT2 in mice [1]), sugar degradation occurs by glycolysis and mitochondrial respiration. As a result, the energetic status of  $\beta$ -cells rises and the increased ATP/ADP ratio inhibits ATP-sensitive  $K^+$  channels ( $K_{ATP}$ ) [2]. The classical view focus on depolarization after glucose-conditioned closure of  $K_{ATP}$ , which activates voltage dependent  $Ca^{2+}$  channels (VDCC) and triggers hormone release. However, the coupling between glucose rise and insulin release is not a fully elucidated process and both triggering and amplifying pathways must be considered in order to better understand  $\beta$ -cell pathophysiology [3].

## INSULIN SECRETION IS A HIGHLY REGULATED PROCESS

Pancreatic  $\beta$ -cells are targets for several modulators, which makes insulin secretion a finely tuned process. Autocrine regulation of  $\beta$  cells occurs through the self-secreted insulin and neural growth factor (NGF) and their interaction with insulin receptor (IR) and both high (TrkA) and low (p75) affinity NGF auto-receptors [4, 5]. On the other hand, the pancreatic amyloid polypeptide amylin, decreases insulin secretion and amylin itself, through a  $K_{ATP}$ -mediated hyperpolarization [6]. Human amylin could also

participate in islet dysfunction when it is hypersecreted and aggregated, as observed in other amyloid proteins related pathologies, like Alzheimer disease [7]. Other receptors mediate an incretin effect, where gastrointestinal peptides like glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) and glucagon-like peptide-1 (GLP-1) increase insulin secretion in different ways, offering novel therapeutic approaches in diabetes [8].

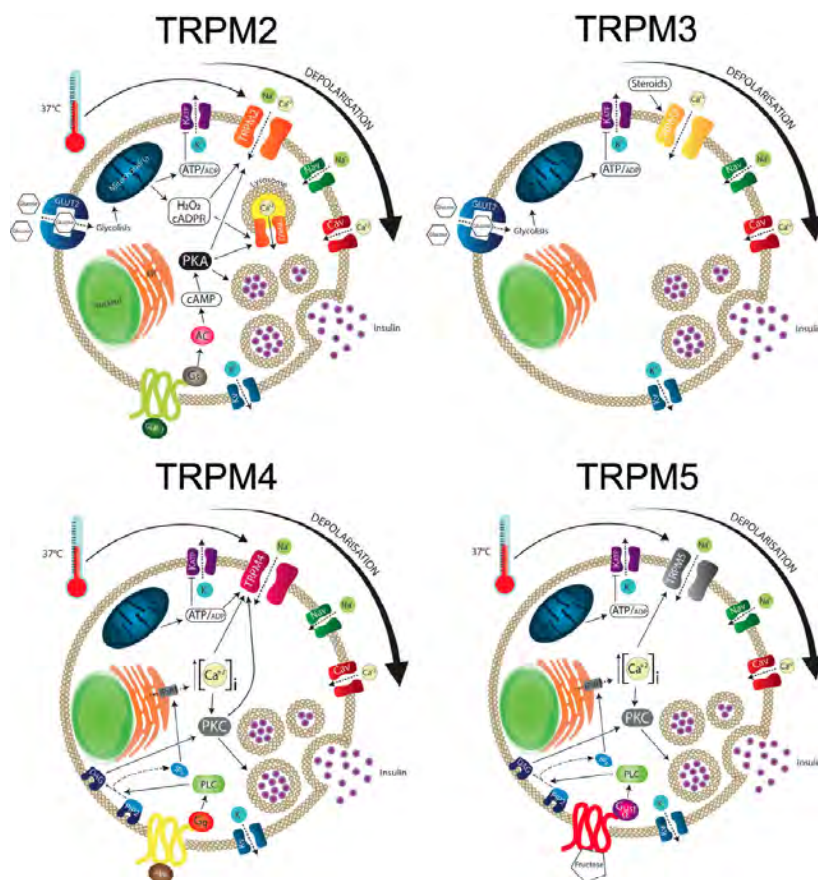
Beta cells also express muscarinic Gq-coupled M3 receptors, which activate a non-selective  $Na^+$  leak channel, (NALCN) [9-11]; as well as  $\alpha_2$ -adrenergic and ionotropic GABA<sub>A</sub> receptors. The parasympathetic and sympathetic branches of the autonomous nervous system exert activation and inhibition of insulin secretion, respectively, through their corresponding neurotransmitters acetylcholine and norepinephrine as reviewed elsewhere [12], while GABA has been associated with an autocrine enhancement of insulin secretion [13].

## TRP CHANNELS IN INSULIN-SECRETING CELLS

Eventhough exocytosis of insulin-containing granules during GSIS correlates with membrane voltage and cytosolic  $Ca^{2+}$  oscillations among species, the subjacent ion channels may differ between models. Recently, the identity and participation of cationic non-selective (CAN) currents in GSIS have been the aim of intense study. This is the case of Transient Receptor Potential channels (TRP), a group of multi-stimuli integrative molecules, which are ubiquitously expressed in sensory tissues.

TRP channels comprise a superfamily of seven distinct classes according to their sequence homologies: canonical (C), vanilloid (V), melastatin (M), ankyrin (A), polycystin (PP), mucolipin (ML) and the no-mechanoreceptor potential channel C (N) that does not possess homologs in mammals [14-16]. Many of those have been detected in insulin secret-

\*Address correspondence to this author at the Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. División de Neurociencias, Departamento de Neurodesarrollo y Fisiología. Ciudad Universitaria, Circuito Ext. UNAM, Coyoacán, México DF. CP 04510, México; Tel: 52-55-56225665; Fax: 52-55-56225747; E-mails: [cmanlio@email.ifc.unam.mx](mailto:cmanlio@email.ifc.unam.mx), [csanchez@ifc.unam.mx](mailto:csanchez@ifc.unam.mx)



**Fig. (1). TRPM channel modulation by protein kinases in  $\beta$ -cells.** TRPM channels can be located in the plasma membrane and other vesicular compartments, where they integrate several endogenous and exogenous signals in  $\beta$ -cells (i.e. oxidative stress, temperature, pH, intracellular calcium and neurotransmitter). They can be modulated directly or indirectly by signaling cascades of protein kinases. The schemes resume the mechanisms leading to TRPM channels gain or loss of function that take place in  $\beta$ -cells where a constellation of GPCR and Tyr kinase receptors integrate several signals, such as neurotransmitters, hormones and growth factors. In the cartoon, the already known signaling pathways of TRPM channels modulation are highlighted, which play significant roles in the mature islet  $\beta$ -cell physiopathology. As observed, the receptor-related mechanisms by which TRPM could be modulated are redundant, since protein kinases activation usually affects cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations by releasing it from intracellular stores, thus reinforcing the activation effect of phosphorylation. The potential connection between sweet receptors and  $\text{Ca}^{2+}$  mediated activation of CAN currents is also highlighted. Along with the regulatory cascades of TRPM channels, the ionic components of glucose-stimulated insulin secretion process ( $K_{\text{ATP}}$  and voltage dependent ion channels) were also included.

ing cell lines and native  $\beta$ -cells from different species [17], with a significant incidence of thermosensitive channels [18]. Members of the TRPC, TRPV and TRPM families have been related to metabolic disorders such as diabetes mellitus, obesity and hypertension, which make them interesting for biomedical research [19].

Recent advances in elucidating the role of TRPM channels constitute an important issue for understanding  $\beta$ -cell physiology, linking GSIS to steroid hormones, cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  elevation and incretins effects [20]. The modulation of  $\beta$  cell activity by these hormones usually involve phosphorylation cascades that promote  $\text{Ca}^{2+}$  release from intracellular reservoirs and  $\text{Ca}^{2+}$  influx through plasma membrane ionic channels, such as TRP members. The present review will focus on phosphorylation of TRPM channels present in  $\beta$  cells and its possible participation in insulin secretion.

As reference, we will comment on TRPM8 and TRPV1 channels, which have been extensively studied [14, 21], and particularly TRPV1 that has been related to pancreatic islets

physiology. Moreover, some authors have observed the RNA transcript and protein in rat pancreas and insulinoma cell lines. This has been correlated to an increased insulin secretion in response to capsaicin (a TRPV1 agonist) at doses between  $10^{-10}$  to  $10^{-8}$  M, which can be reverted by the antagonist capsazepine [22]. The presence of TRPV1 channel in  $\beta$  cells is still controversial [17]. Recently, Fågelskiöld and coworkers (2012) found that INS-1E cells, but not native  $\beta$ -cells (rat or human) express functional TRPV1 channels [23]. However, this channel plays a critical role in sensory innervation of pancreatic islets. It is present in the terminals of substance P and calcitonin gene related peptide (CGRP) secreting fibers, regulating islet inflammation, insulin release and overall glucose homeostasis [24, 25].

#### TRPM RELATIVES IN INSULIN-SECRETING CELLS

Up to date, four members of the TRPM family have been reported in  $\beta$ -cells as functional channels, TRPM2, TRPM3, TRPM4 and TRPM5 (Fig. 1).

TRPM2 is an oxidative stress-activated  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable channel, located in plasma membrane and lysosomes of insulin secreting cells [26, 27]. It has been suggested that TRPM2 channels could participate in GSIS and apoptosis, and play a significant role in the development of diabetes [28]. This channel is directly co-activated in excised patches by intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  and ADP-ribose (ADPR), as well as by the low-affinity full agonist NAAD and the partial agonist NAADP [29]. At least, four  $\text{Ca}^{2+}$  ions seem to be necessary to activate TRPM2 by a cooperative binding to deep crevices in the protein [30]. TRPM2 *knockout* mice are intolerant to glucose and show a deficient insulin secretion [18]. Beta cells from this KO mouse show a decreased insulin secretion due to a low intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  response and to high glucose and 10 nM of the glucagon-like peptide-1 (GLP-1). Furthermore, this reduced response was also observed with the  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channel blocker, diazoxide and with depolarizing  $\text{K}^+$  concentrations, in the presence of high (16.7 mM), but not low (3.3 mM) extracellular glucose concentrations.

According to their results, Uchida and coworkers [31] proposed that TRPM2 channels are sensors of gut and metabolic signals and are modulators of insulin secretion by  $\text{Ca}^{2+}$  dependent and independent mechanisms. It is worth to mention that their presence could be equally relevant in other species such as rat and humans. In the rat insulinoma cell line RIN-m5F cells,  $\text{H}_2\text{O}_2$  application to the incubating bath solution increases intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  sensitive fluorescence signals, which means that TRPM2 is activated by hydroxyl-radicals [32].

In TRPM2 channels heterologous expressed in HEK-293 cells, the non-specific TRP blocker 2- aminoethoxydiphenyl borate (2-APB), abolished intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  increase induced by heat and cyclic ADPR (cADPR) [33]. In this study, insulin secretion in rat pancreatic islets stimulated by high glucose, heat and exendin-4 (an agonist of GLP-1 receptors) was reduced by 2-APB as well.

Wagner and co-workers recently described a link between steroid stimulation of TRPM3 and insulin secretion [34]. They demonstrated that pregnenolone sulfate (PS), and nifedipine, increased  $\text{Ca}^{2+}$  sensitive fluorescence and currents in TRPM3-transfected HEK-293 cells, as well as in native channels from the insulin secreting cell line INS-1. Moreover, they found that PS also induced a  $\text{Ca}^{2+}$  increment in mouse-isolated  $\beta$ -cells. Further evidence regarding TRPM3 physiological activators and signaling is needed to fully unravel the possible role of this channel in insulin secretion.

The functions of TRPM channels seem to be more complex than merely triggering depolarization. They may increase the efficiency and amplify the mechanisms of insulin secretion, which has been described for TRPM4 and TRPM5 [35]. These two closely related non-selective channels are permeable to monovalent cations and show a unitary conductance of around 25 pS. They also share the activation mechanism by intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ , with an  $\text{EC}_{50}$  of  $0.7 \pm 0.1$   $\mu\text{M}$  for TRPM5, and a 10-fold lower affinity for TRPM4 [36]. Prawitt and colleagues [37] have also proposed that TRPM5 is actually activated by the rate of increase in  $\text{Ca}^{2+}$  concentration instead the absolute final concentration of the divalent ion. However, both channels could participate in

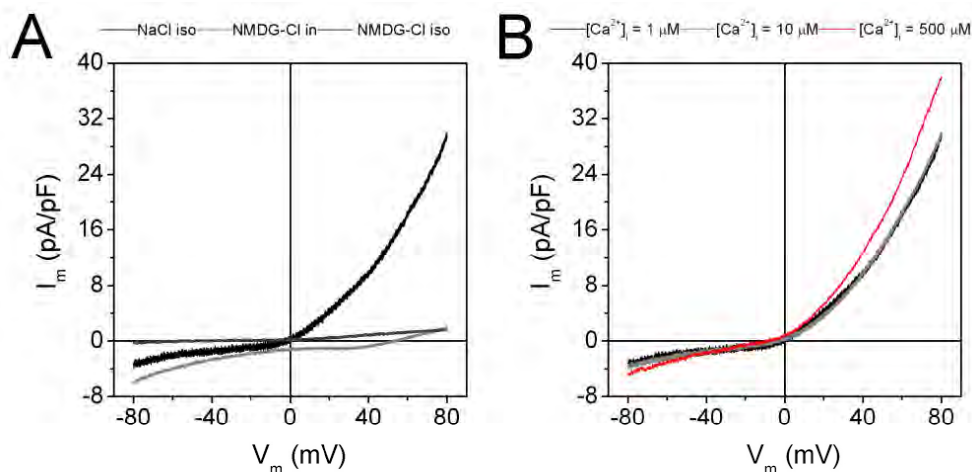
early depolarization of  $\beta$ -cell membrane, after  $\text{K}_{\text{ATP}}$  closure. By inducing depolarization, TRPM5 channels seem to play a transcendental role in the activation of voltage gated channels [35], which makes them a potential target for modulation of insulin secretion [38].

Macroscopic current to voltage (IV) relationships of this thermo-sensitive channels rectify at positive potentials, reflecting some voltage sensitivity. Moreover, TRPM4 and TRPM5 are positively modulated by PIP2 [39-41], and inhibited by acidic extracellular pH [42], intracellular spermin, flufenamic acid [36] and the specific blockers 9-phenanthrol and triphenylphosphine oxide respectively [43, 44]. Remarkably, it has been observed that intracellular ATP inhibits TRPM4, but not TRPM5 [36]. However, the activation of cationic non-selective currents by intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ , a common process to both channels, is a property that has been reported in many cell lines and can be observed in native rat  $\beta$ -cells (Fig. 2).

The evidence of a TRPM4-like current in insulin-secreting cells can be found as early as 1987, when Sturgess and colleagues demonstrated the existence of a non-selective current in the rat insulinoma CRI-G1. They probed that this current rectified at positive potentials, at the single-channel level, and it is activated by intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  ( $> 10^{-4}$  M), as well as inhibited by ATP by the cytoplasmic side [45]. Interestingly, AMP and ADP also block this current with a high potency [46], raising the question if nucleotide ratio modulates the current in an opposite fashion compared to  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channels. TRPM4 transcripts have been detected in several cell lines such as INS-1 and RIN-m5F from rat, and HIT-T15 from hamster, where the heterologous expression of a truncated form of the channel results in impaired GSIS [47]. Using this construct, which prevents channels multimerization, authors demonstrated that insulin secretion induced by arginine vasopressin (AVP) was reduced by the suppression of TRPM4 activity, without affecting insulin release in response to with high  $\text{K}^+$  depolarization or L-arginine. Moreover, Cheng and coworkers reported that TRPM4-containing vesicles translocate to plasmatic membrane when cells are exposed to high  $\text{Ca}^{2+}$  [47].

TRPM4-like currents and its mRNA have been described in mouse  $\beta$ -TC3, MIN-6 and other cell lines by Marigo and co-workers [48]. They observed immunoreactivity and colocalization of TRPM4 and insulin in human islets. They also found this association in a glucagon-secreting  $\alpha$ -cell line, suggesting a wide, non-specific expression of this channel in endocrine pancreas. Authors reported diminished  $\text{Ca}^{2+}$  signals in N terminus respect to C terminus heterologous truncated TRPM4 channels in response to AVP and the  $\text{K}_{\text{ATP}}$  blocker glyburide, and a concomitant reduction of insulin secretion when stimulated with both substances. However, the lack of TRPM4 *in vivo* does not cause glucose intolerance in mice [49], which is paradoxically opposed to previous evidence, probably because of compensating mechanisms during  $\beta$ -cells ontogeny from TRPM4 *knockout* mice. Other plausible explanations could be the over expression of this channel in insulinomas, or a differential expression among species.

TRPM5 is essential for taste perception and is activated through the G protein gustducin pathway. After binding of



**Fig. (2).** Ca<sup>2+</sup>-activated cationic non-selective currents from native isolated rat  $\beta$ -cells. **A:** Average current to voltage (IV) curves from  $\beta$ -cells recorded with 1  $\mu$ M of free Ca<sup>2+</sup> in the internal solution and isometric concentrations of NaCl (N=7), replacement of internal Na<sup>+</sup> for NMDG<sup>+</sup> (N=3) or isometric NMDG<sup>+</sup> (n=2). Instantaneous IV curves were obtained by ramp protocols from -80 to 80 mV at a depolarizing rate of 0.5 mV/ms. **B:** Traces represent the average instantaneous IV curve from  $\beta$ -cells, obtained by whole cell patch clamp in the presence of 1  $\mu$ M (N=7), 10  $\mu$ M (N=26) and 500  $\mu$ M (N=12) of intracellular free Ca<sup>2+</sup>.

taste molecules, gustducin coupled receptor (GPCR) activates PLC $\beta$ 2, inducing the breakdown of PIP2 to DAG and IP3. The latter binds to intracellular Ca<sup>2+</sup> receptors mainly located in the endoplasmic reticulum, increasing the intracellular Ca<sup>2+</sup> that directly activates TRPM5 [50]. Particularly, this channel is involved in the codification and integration of sweet, umami and bitter tastes [51]. Supporting the latter, the responses of taste-sensitive fibers from TRPM5 knockout mice cannot be blocked by the TRPM5 inhibitor quinine [52].

In many chemical-sensitive tissues, such as the olfactory epithelium and gastrointestinal tract, channel expression has been demonstrated [53]. At the mRNA level, it has also been detected in neurons, insulinomas (MIN6 and INS-1) and human islets [37]. It is worth mentioning that functional taste receptors and gustducin, which participate in the TRPM5 activation cascade in taste buds, have been also detected in MIN6 cells [54]. The presence of sweet receptors in  $\beta$ -cells determines the modulation of GSIS by fructose through activation of TRPM5 currents [55]. These results also suggest a mechanism that may connect the synthetic sweeteners to insulin secretion.

A Ca<sup>2+</sup>-activated CAN current with activation constant and permeability similar to TRPM5 has been studied in mice too. TRPM5 knockout mice present reduced Ca<sup>2+</sup>-dependent currents respect to wild type animals, causing a reduction of  $\beta$ -cell membrane potential and cytosolic Ca<sup>2+</sup> oscillations in response to changes in extracellular glucose from 3 to 10 mM [56]. In this study, TRPM5 deficient islets also showed reduced insulin secretion whereas KO mice were intolerant to oral and intraperitoneal glucose tests. Similarly, an independent group described that TRPM5<sup>-/-</sup> islets present a reduced sensitivity to high glucose and an impaired insulin secretion in response to arginine [57].

Prawitt and colleagues (2003) detected TRPM5 transcripts in the rat cell line INS-1 and human islets, using RT-PCR. Whole cell patch clamp recordings from INS-1 cells showed an intracellular Ca<sup>2+</sup> dependent, positive rectifying

and nonselective cation permeable current as described for TRPM5 channels. Moreover, when isolated rat  $\beta$ -cells were incubated with thapsigargin, which blocks Ca<sup>2+</sup> recapture and contributes to emptying of intracellular reservoirs, the rectifying CAN currents increase as well as Ca<sup>2+</sup> influx and insulin secretion [58].

Taken together, the evidence suggests that intracellular Ca<sup>2+</sup> sensitive CAN currents, with positive voltage rectifying properties, could be due to TRPM4 and/or TRPM5 channels. Further research combining molecular biology, pharmacology and electrophysiology, must be done in other species, to identify and understand the role of these channels in insulin release. Clearly, human  $\beta$ -cells have received special attention in order to develop novel drugs to control TRP channels participating in insulin related dysfunctions [59], however, a full comprehension of murine models in physiopathological contexts is also necessary.

#### AIMING THE SPYGLASS TO PHOSPHORYLATION

Protein kinases catalyze the transfer of phosphate groups from a high-energy bond metabolite (usually ATP) to specific protein substrates, modulating many cellular functions, including enzyme kinetics, binding affinities and channel activity. Many protein kinases are present in insulin-secreting cells linking intra and extracellular signals to metabolic and ionic processes and constituting an essential process in GSIS [60]. Protein kinase A (PKA), a cAMP-dependent serine/threonine kinase, increase insulin secretion by inhibiting the repolarizing currents through voltage-gated K<sup>+</sup> channels [61, 62], augmenting Ca<sup>2+</sup> influx through voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels [63-66] and Ca<sup>2+</sup> release from intracellular stores [67-70]. Moreover, PKA also inhibits the activity of K<sub>ATP</sub> channels [71] and promotes the exocytosis of insulin-containing granules [72, 73].

Incretins and hormones that interact with GPCRs that are coupled to G<sub>s</sub> subunits, activate adenylate cyclases (AC) and cAMP production leading to PKA activation and promoting insulin release [74-76]. In fact, signals increasing cAMP

regulate insulin secretion [77] and the overall  $\beta$ -cell homeostasis, including proliferation and survival [78]. TRP channels are widely regulated by phosphate binding, as documented in many members of this family [79]. TRPM2 channels are important effectors in PKA signaling, as TRPM2 knockout mice show an impaired response to incretins [31]. Previously, Togashi and coworkers [80] demonstrated in RINm5F cells and isolated rat  $\beta$ -cells that a heat-induced increase in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  occurs similarly to TRPM2-expressing HEK-293 cells. Furthermore, the effect of temperature on  $\text{Ca}^{2+}$  response was decreased by treatment with small interference RNA against TRPM2, or addition of channel inhibitors. In accordance forskolin potentiated TRPM2 currents in transfected HEK-293 cells, and the PKA inhibitor H89 reversed this effect. Moreover, a significant increment in insulin secretion of forskolin-treated native rat islets occurred when stimulated with high glucose, even in the presence of nimodipine. Finally, Tominaga and his group [80] suggested a functional link between incretins and GSIS through a PKA signaling pathway, because the GLP-1 agonist, exendin-4, increases GSIS by a PKA dependent mechanism.

TRPM8, which is also regulated by the cAMP/PKA pathway [81], is the closest related channel to TRPM2 and one of the best characterized TRP channels [14]. However, PKA phosphorylation, as well as protein kinase C (PKC) signaling pathways, reduces TRPM8 activity [82]. Although the expression of TRPM8 channels has not been detected in murine  $\beta$ -cells [59] and the outcomes of a signaling pathway could differ from a TRP member to another, it is worth to mention that several phosphorylation cascades modulate a close-related channel by direct and indirect mechanisms [83-85], which is likely to occur with TRPM2 in  $\beta$ -cells. Although it is clear that TRPM2 is regulated by GLP-1, to our knowledge, the exact phosphorylation site(s) in TRPM2 for PKA or any other protein kinase has not been identified yet.

Surprisingly, there are evidences of a crosstalk between PKA and PKC in insulin-secreting cells. It has been shown that in INS-1 cells, GLP-1 and forskolin sensitizes  $\text{IP}_3$  receptors via PKA, which mobilizes  $\text{Ca}^{2+}$  from intracellular stores and activates PLC, which finally causes PKC activation [86]. Moreover, PKC can modulate AC activity through inhibition of Gi subunits, reducing the inhibitory effect of noradrenaline on insulin secretion [87, 88]. PKC is also responsible for a proper phosphorylation state of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels [89] and plays an important role in the cholinergic regulation of  $\beta$ -cells [90].

PKC phosphorylation is well recognized as a modulatory pathway of TRPM4 activity [91]. Nilius and coworkers [92] firstly reported that 1 hour pre-incubation with PMA of heterologous human TRPM4 expressed in HEK-293 cells, reduced the  $\text{EC}_{50}$  for  $\text{Ca}^{2+}$  activation of TRPM4 whole cell currents in a PKC-dependent manner, with two critical residues for phosphorylation at S1145 and S1152 (Table 1). The physiological relevance of TRPM4 gain of function due to phosphorylation by PKC has been described in cerebral artery smooth muscle, where it induces vasoconstriction [93]. Besides, TRPM4 participates in vasopressin-stimulated insulin secretion [48] increasing the cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  and the production of DAG [94]. This link between PKC phosphoryla-

tion and TRPM4 activity could reflect a reciprocal interaction, since DAG and the augmented intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  activate various PKC isoforms.

Interestingly, PKC activation increases insulin secretion in part by closure of  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channels [95, 96], which seems to be a common effect to various phosphorylation pathways, such as PKA [71, 97] and the PI3K-activated AMP-dependent kinase (AMPK) [98]. The latter kinases are downstream effectors of surface receptors with intrinsic tyrosine-kinase activity, such as the neurotrophin receptors, which may also recruit an isoform of PLC, leading to PKC activation [99].

Tyrosine kinases (TK) participate in signaling cascades determining robustness of GSIS, as well as  $\beta$ -cells fate and maturation [4, 100-110]. Insulin itself possesses receptors with tyrosine-kinase activity which may exert a modulation of TRPM channels in insulin-secreting cells. PI3K, a downstream kinase in the insulin pathway, has been proposed to participate in autocrine regulation  $\beta$ -cells [111]. Moreover, it is known that insulin signaling leading to PI3K activation promotes translocation of TRPV2 channels to plasma membrane, increasing the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  and enhancing insulin release in MIN6 cells [112].

The neurotrophin nerve growth factor (NGF), a ligand for receptors with TK activity, causes short and long-term effects on voltage-gated ion channels in rat  $\beta$ -cells. Incubation with NGF promotes  $\text{Ca}^{2+}$  influx through L-type channels and potentiates insulin secretion [5]. In fact, two mechanisms have been proposed, augmentation in the number of ion channels in  $\beta$ -cell surface and a positive modulation of channel activity [104]. NGF also strengthens insulin secretion by inducing the expression of voltage-sensitive  $\text{Na}^+$  channels [105], which suggest that NGF regulation of ion channels involves transcriptional processes, channel stability and probably channel recycling.

We can find some evidences on NGF modulation of TRP channels in the TRPV1 member, which is probably the most studied TRP channel. TRPV1 is also sensitized through activation of the PI3K and MAPK pathways [113, 114], which are related to NGF signaling. This channel is a substrate for several protein kinases, linking a great number of inflammatory mediators with its activity [115]. Moreover, the PI3K-mediated sensitization of TRPV1 induced by NGF causes an increment of TRPV1 trafficking to plasma membrane, without affecting the affinity for capsaicin [116]. However, other studies did not observe that tyrosine phosphorylation on TRPV1 was a critical step in this sensitization process, while it has been proposed that phosphorylation of Y200 by Src kinases is involved in this process [117]. Interestingly, insulin and insulin-like growth factor I sensitize TRPV1 channels in a PI3K and PKC-dependent manner. These hormones increased the number of functional channels in the plasma membrane, as well as the open probability of single channels [118]. Considering the number of physiopathological conditions in which trophic factors and inflammatory mediator levels vary, such as metabolic syndrome [119] and diabetes [108], the connection between their signaling events and TRP channel activity seems to be a promising field of research.

**Table 1. Sequence Alignments of TRPM Channels Present in  $\beta$ -cells. The Phosphorylation Site in Ser 1145 of Human TRPM4 channel Described by Nilius and Coworkers [69] is Conserved Among Species but is not Shared with TRPM2 or TRPM5. Ser 1152 is Present in TRPM2 but it is Located in a Low Score Phosphorylation Site, thus Ser 1145 and Ser 1152 Seem to be Exclusive PKC phosphorylation Sites for TRPM4. There is Another High Score Potential Residue for PKC Phosphorylation at Ser 1142, which is Conserved in TRPM5 Too, but it has not been Studied to our Knowledge**

TRPM Member	Residue	Consensus																
M4 human iso 1	1136	R	A	R	D	K	R	E	S	D	S	E	R	L	K	R	T	S
M4 human iso 2	991	R	A	R	D	K	R	E	S	D	S	E	R	L	K	R	T	S
M4 mouse	1135	Q	A	R	D	K	R	D	S	D	S	E	R	L	K	R	T	S
M4 rat	1130	Q	A	R	D	K	R	D	S	D	S	E	R	L	K	R	T	S
M5 human	1066	M	E	K	R	R	R	D	S	E	G	E	V	L	R	K	T	A
M5 mouse	1065	M	E	K	R	R	R	D	S	E	G	E	V	L	R	K	T	A
M5 rat	1063	M	E	K	R	R	R	D	S	E	E	E	V	L	R	K	T	A
M2 human	1136	R	Q	F	Q	Q	K	Q	R	P	E	Q	K	I	E	D	I	S
M2 mouse	1133	Q	Q	Y	Q	Q	K	Q	R	P	E	Q	K	I	Q	D	I	S
M2 rat	1134	Q	Q	Y	Q	H	K	Q	R	P	E	Q	K	I	Q	D	I	S

Whether there are no reports about a direct modulation of  $\beta$ -cell related TRPM channels by NGF through its high affinity tyrosine kinase receptor (TrkA), it has been demonstrated that  $H_2O_2$  and TNF $\alpha$ , two activators of TRPM2 channels in intact cells, increased tyrosine phosphorylation through Src kinases, which could be prevented by the broad range inhibitor genistein, or the more specific Src inhibitor PP2 [120]. Moreover, Zhang and coworkers [120] demonstrated a direct interaction between TRPM2 and the protein tyrosine phosphatase-L1 (PTPL1), which prevented TRPM2 tyrosine phosphorylation and the  $H_2O_2$ -mediated cytosolic  $Ca^{2+}$  rise when both proteins were co-expressed in HEK-293T cells. The authors also show that down-regulation of PTPL1 reduced viability when incubated with 1 mM  $H_2O_2$  by increased apoptosis and necrosis, giving rise to many questions about the transcendental role that tyrosine phosphorylation could play in native TRPM channel-expressing tissues, including pancreatic  $\beta$ -cells.

## REMARKS AND PERSPECTIVES

The most relevant findings concerning TRP channels in native  $\beta$ -cells have been achieved in rodents. Nevertheless, there is a long road of exploration about the role of these channels in humans. It is also important to understand how their biophysical properties, expression, trafficking and modulation vary in pathological contexts like obesity, metabolic syndrome or diabetes mellitus. As an example, some single nucleotide polymorphisms in the TRPM5 locus have been associated with prediabetic phenotypes, thus providing an increased risk for type 2 diabetes mellitus. In the study, subjects carrying these genetic variations also showed reduced insulin sensitivity, which suggest a complex participa-

tion of TRPM5 in glucose homeostasis, perhaps including pituitary mechanisms [121].

Undoubtedly, TRP members involved in insulin secretion constitute therapeutically attractive targets, as previously suggested [18, 34, 47, 59]. Furthermore, there is a significant connection between TRPM channels and GPCRs, which are diverse and widely expressed in  $\beta$ -cells, resulting in attractive therapeutic targets too [122].

In this scenario, phosphorylation arises as a major issue since  $\beta$ -cells present a vast battery of protein kinases, which are involved in signaling cascades of neurotransmitters, hormones and growth factors, and modulate the robustness of insulin secretion but also the death/survival fate of  $\beta$ -cells. There is a lot of interest and a promising field of investigation about the particular kinases from which TRPM channels are substrates and the residues which are susceptible to be phosphorylated. Indeed, the study of TRPM phosphorylation would lead us one more time to integrate from ion channel activity to hormone release in  $\beta$ -cell physiopathology.

## CONFLICT OF INTEREST

The author(s) confirm that this article content has no conflicts of interest.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Dr. Leon D. Islas for critical discussion of the manuscript. To A.S. Gandini for art work. M. Hiriart is supported by CONACYT CB2009-131647, and DGAPA-PAPIIT IN215611, Universidad Nacional Autónoma de México. C.M. Diaz-Garcia is the recipient of a Doctoral Fellowship (Becario: 245301) from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material is available on the publishers Web site along with the published article.

## REFERENCES

- [1] De Vos, A.; Heimberg, H.; Quartier, E.; Huypens, P.; Bouwens, L.; Pipeleers, D.; Schuit, F. *J Clin Invest*, **1995**, *96*, 2489-95.
- [2] Cook, D. L.; Hales, C. N. *Nature*, **1984**, *311*, 271-3.
- [3] Henquin, J. C. *Diabetes Res Clin Pract*, **2011**, *93 Suppl 1*, S27-31.
- [4] Rosenbaum, T.; Vidaltamayo, R.; Sanchez-Soto, M. C.; Zentella, A.; Hiriart, M. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1998**, *95*, 7784-8.
- [5] Rosenbaum, T.; Sanchez-Soto, M. C.; Hiriart, M. *Diabetes*, **2001**, *50*, 1755-62.
- [6] Wagoner, P. K.; Chen, C.; Worley, J. F.; Dukes, I. D.; Oxford, G. S. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1993**, *90*, 9145-9.
- [7] Miklossy, J.; Qing, H.; Radenovic, A.; Kis, A.; Vileno, B.; Laszlo, F.; Miller, L.; Martins, R. N.; Waeber, G.; Mooser, V.; Bosman, F.; Khalili, K.; Darbinian, N.; McGeer, P. L. *Neurobiol Aging*, **2010**, *31*, 1503-15.
- [8] Ahren, B. *Diabetes Obes Metab*, **2011**, *13 Suppl 1*, 158-66.
- [9] Swayne, L. A.; Mezghrani, A.; Varrault, A.; Chemin, J.; Bertrand, G.; Dalle, S.; Bourinnet, E.; Lory, P.; Miller, R. J.; Nargeot, J.; Monteil, A. *EMBO Rep*, **2009**, *10*, 873-80.
- [10] Gilon, P.; Rorsman, P. *EMBO Rep*, **2009**, *10*, 963-4.
- [11] Swayne, L. A.; Mezghrani, A.; Lory, P.; Nargeot, J.; Monteil, A. *Islets*, **2010**, *2*, 54-6.
- [12] Ashcroft, F. M.; Rorsman, P. *Prog Biophys Mol Biol*, **1989**, *54*, 87-143.
- [13] Braun, M.; Ramracheya, R.; Bengtsson, M.; Clark, A.; Walker, J. N.; Johnson, P. R.; Rorsman, P. *Diabetes*, **2010**, *59*, 1694-701.
- [14] Nieto-Posadas, A.; Jara-Oseguera, A.; Rosenbaum, T. *Curr Top Med Chem*, **2011**, *11*, 2131-50.
- [15] Venkatachalam, K.; Montell, C. *Annu Rev Biochem*, **2007**, *76*, 387-417.
- [16] Li, M.; Yu, Y.; Yang, J. *Adv Exp Med Biol*, **2011**, *704*, 1-23.
- [17] Islam, M. S. *Adv Exp Med Biol*, **2011**, *704*, 811-30.
- [18] Uchida, K.; Tominaga, M. *Endocr J*, **2011**.
- [19] Zhu, Z.; Luo, Z.; Ma, S.; Liu, D. *Pflugers Arch*, **2011**, *461*, 211-23.
- [20] MacDonald, P. E. *Diabetes*, **2011**, *60*, 28-9.
- [21] Jara-Oseguera, A.; Simon, S. A.; Rosenbaum, T. *Curr Mol Pharmacol*, **2008**, *1*, 255-69.
- [22] Akiba, Y.; Kato, S.; Katsube, K.; Nakamura, M.; Takeuchi, K.; Ishii, H.; Hibi, T. *Biochem Biophys Res Commun*, **2004**, *321*, 219-25.
- [23] Jabin Fagelskiold, A.; Kannisto, K.; Bostrom, A.; Hadrovic, B.; Farre, C.; Eweida, M.; Wester, K.; Islam, M. S. *Islets*, **2012**, *4*.
- [24] Razavi, R.; Chan, Y.; Afifiyan, F. N.; Liu, X. J.; Wan, X.; Yantha, J.; Tsui, H.; Tang, L.; Tsai, S.; Santamaria, P.; Driver, J. P.; Serreze, D.; Salter, M. W.; Dosch, H. M. *Cell*, **2006**, *127*, 1123-35.
- [25] Gram, D. X.; Ahren, B.; Nagy, I.; Olsen, U. B.; Brand, C. L.; Sundler, F.; Tabanera, R.; Svendsen, O.; Carr, R. D.; Santha, P.; Wierup, N.; Hansen, A. J. *Eur J Neurosci*, **2007**, *25*, 213-23.
- [26] Lange, I.; Yamamoto, S.; Partida-Sanchez, S.; Mori, Y.; Fleig, A.; Penner, R. *Sci Signal*, **2009**, *2*, ra23.
- [27] Inamura, K.; Sano, Y.; Mochizuki, S.; Yokoi, H.; Miyake, A.; Nozawa, K.; Kitada, C.; Matsushime, H.; Furuichi, K. *J Membr Biol*, **2003**, *191*, 201-7.
- [28] Takahashi, N.; Kozai, D.; Kobayashi, R.; Ebert, M.; Mori, Y. *Cell Calcium*, **2011**, *50*, 279-87.
- [29] Toth, B.; Csanady, L. *J Biol Chem*, **2010**, *285*, 30091-102.
- [30] Csanady, L.; Torocsik, B. *J Gen Physiol*, **2009**, *133*, 189-203.
- [31] Uchida, K.; Dezaki, K.; Damdindorj, B.; Inada, H.; Shiuchi, T.; Mori, Y.; Yada, T.; Minokoshi, Y.; Tominaga, M. *Diabetes*, **2011**, *60*, 119-26.
- [32] Ishii, M.; Shimizu, S.; Hara, Y.; Hagiwara, T.; Miyazaki, A.; Mori, Y.; Kiuchi, Y. *Cell Calcium*, **2006**, *39*, 487-94.
- [33] Togashi, K.; Inada, H.; Tominaga, M. *Br J Pharmacol*, **2008**, *153*, 1324-30.
- [34] Wagner, T. F.; Loch, S.; Lambert, S.; Straub, I.; Mannebach, S.; Mathar, I.; Dufer, M.; Lis, A.; Flockerzi, V.; Philipp, S. E.; Oberwinkler, J. *Nat Cell Biol*, **2008**, *10*, 1421-30.
- [35] Enklaar, T.; Brixel, L. R.; Zabel, B. U.; Prawitt, D. *Islets*, **2010**, *2*, 337-8.
- [36] Ullrich, N. D.; Voets, T.; Prenen, J.; Vennekens, R.; Talavera, K.; Droogmans, G.; Nilius, B. *Cell Calcium*, **2005**, *37*, 267-78.
- [37] Prawitt, D.; Monteilh-Zoller, M. K.; Brixel, L.; Spangenberg, C.; Zabel, B.; Fleig, A.; Penner, R. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2003**, *100*, 15166-71.
- [38] Liman, E. R. *Islets*, **2010**, *2*, 331-3.
- [39] Nilius, B.; Mahieu, F.; Prenen, J.; Janssens, A.; Owsianik, G.; Vennekens, R.; Voets, T. *EMBO J*, **2006**, *25*, 467-78.
- [40] Zhang, Z.; Okawa, H.; Wang, Y.; Liman, E. R. *J Biol Chem*, **2005**, *280*, 39185-92.
- [41] Liu, D.; Liman, E. R. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2003**, *100*, 15160-5.
- [42] Liu, D.; Zhang, Z.; Liman, E. R. *J Biol Chem*, **2005**, *280*, 20691-9.
- [43] Grand, T.; Demion, M.; Norez, C.; Mettey, Y.; Launay, P.; Becq, F.; Bois, P.; Guinamard, R. *Br J Pharmacol*, **2008**, *153*, 1697-705.
- [44] Palmer, R. K.; Atwal, K.; Bakaj, I.; Carlucci-Derbyshire, S.; Buber, M. T.; Cerne, R.; Cortes, R. Y.; Devantier, H. R.; Jorgensen, V.; Pawlyk, A.; Lee, S. P.; Sprouds, D. G.; Zhang, Z.; Bryant, R. *Assay Drug Dev Technol*, **2010**, *8*, 703-13.
- [45] Sturgess, N. C.; Hales, C. N.; Ashford, M. L. *Pflugers Arch*, **1987**, *409*, 607-15.
- [46] Sturgess, N. C.; Hales, C. N.; Ashford, M. L. *FEBS Lett*, **1986**, *208*, 397-400.
- [47] Cheng, H.; Beck, A.; Launay, P.; Gross, S. A.; Stokes, A. J.; Kinert, J. P.; Fleig, A.; Penner, R. *Cell Calcium*, **2007**, *41*, 51-61.
- [48] Marigo, V.; Courville, K.; Hsu, W. H.; Feng, J. M.; Cheng, H. *Mol Cell Endocrinol*, **2009**, *299*, 194-203.
- [49] Vennekens, R.; Olausson, J.; Meissner, M.; Bloch, W.; Mathar, I.; Philipp, S. E.; Schmitz, F.; Weissgerber, P.; Nilius, B.; Flockerzi, V.; Freichel, M. *Nat Immunol*, **2007**, *8*, 312-20.
- [50] Liman, E. R. *Handb Exp Pharmacol*, **2007**, 287-98.
- [51] Zhang, Y.; Hoon, M. A.; Chandrashekar, J.; Mueller, K. L.; Cook, B.; Wu, D.; Zuker, C. S.; Ryba, N. J. *Cell*, **2003**, *112*, 293-301.
- [52] Talavera, K.; Yasumatsu, K.; Yoshida, R.; Margolskee, R. F.; Voets, T.; Ninomiya, Y.; Nilius, B. *FASEB J*, **2008**, *22*, 1343-55.
- [53] Kaske, S.; Krasteva, G.; Konig, P.; Kummer, W.; Hofmann, T.; Gudermann, T.; Chubanov, V. *BMC Neurosci*, **2007**, *8*, 49.
- [54] Nakagawa, Y.; Nagasawa, M.; Yamada, S.; Hara, A.; Mogami, H.; Nikolaev, V. O.; Lohse, M. J.; Shigemura, N.; Ninomiya, Y.; Kojima, I. *PLoS One*, **2009**, *4*, e5106.
- [55] Kyriazis, G. A.; Soundarapandian, M. M.; Tyrberg, B. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2012**, *109*, E524-32.
- [56] Colsoul, B.; Schraenen, A.; Lemaire, K.; Quintens, R.; Van Lommel, L.; Segal, A.; Owsianik, G.; Talavera, K.; Voets, T.; Margolskee, R. F.; Kokrashvili, Z.; Gilon, P.; Nilius, B.; Schuit, F. C.; Vennekens, R. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2010**, *107*, 5208-13.
- [57] Brixel, L. R.; Monteilh-Zoller, M. K.; Ingenbrandt, C. S.; Fleig, A.; Penner, R.; Enklaar, T.; Zabel, B. U.; Prawitt, D. *Pflugers Arch*, **2010**, *460*, 69-76.
- [58] Cruz-Cruz, R.; Salgado, A.; Sanchez-Soto, C.; Vaca, L.; Hiriart, M. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **2005**, *289*, E439-45.
- [59] Colsoul, B.; Vennekens, R.; Nilius, B. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, **2011**, *161*, 87-110.
- [60] Jones, P. M.; Persaud, S. J. *Endocr Rev*, **1998**, *19*, 429-61.
- [61] MacDonald, P. E.; Wang, X.; Xia, F.; El-kholy, W.; Targonsky, E. D.; Tsushima, R. G.; Wheeler, M. B. *J Biol Chem*, **2003**, *278*, 52446-53.
- [62] Kim, S. J.; Choi, W. S.; Han, J. S.; Warnock, G.; Fedida, D.; McIntosh, C. H. *J Biol Chem*, **2005**, *280*, 28692-700.
- [63] Kanno, T.; Suga, S.; Wu, J.; Kimura, M.; Wakui, M. *Pflugers Arch*, **1998**, *435*, 578-80.
- [64] Gromada, J.; Bokvist, K.; Ding, W. G.; Holst, J. J.; Nielsen, J. H.; Rorsman, P. *Diabetes*, **1998**, *47*, 57-65.
- [65] Suga, S.; Kanno, T.; Dobashi, Y.; Wakui, M. *Jpn J Physiol*, **1997**, *47 Suppl 1*, S13-4.
- [66] Leiser, M.; Fleischer, N. *Diabetes*, **1996**, *45*, 1412-8.
- [67] Gromada, J.; Dissing, S.; Bokvist, K.; Renstrom, E.; Frokjaer-Jensen, J.; Wulff, B. S.; Rorsman, P. *Diabetes*, **1995**, *44*, 767-74.
- [68] Islam, M. S.; Leibiger, I.; Leibiger, B.; Rossi, D.; Sorrentino, V.; Ekstrom, T. J.; Westerblad, H.; Andrade, F. H.; Berggren, P. O. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1998**, *95*, 6145-50.
- [69] Holz, G. G.; Leech, C. A.; Heller, R. S.; Castonguay, M.; Habener, J. F. *J Biol Chem*, **1999**, *274*, 14147-56.
- [70] Dyachok, O.; Gylfe, E. *J Biol Chem*, **2004**, *279*, 45455-61.
- [71] Light, P. E.; Manning Fox, J. E.; Riedel, M. J.; Wheeler, M. B. *Mol Endocrinol*, **2002**, *16*, 2135-44.



- [72] Hatakeyama, H.; Kishimoto, T.; Nemoto, T.; Kasai, H.; Takahashi, N. *J Physiol*, **2006**, *570*, 271-82.
- [73] Kwan, E. P.; Gao, X.; Leung, Y. M.; Gaisano, H. Y. *Pancreas*, **2007**, *35*, e45-54.
- [74] Drucker, D. J.; Philippe, J.; Mojsov, S.; Chick, W. L.; Habener, J. F. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1987**, *84*, 3434-8.
- [75] Amiranoff, B.; Vauclin-Jacques, N.; Laburthe, M. *Biochem Biophys Res Commun*, **1984**, *123*, 671-6.
- [76] Yada, T.; Sakurada, M.; Ihida, K.; Nakata, M.; Murata, F.; Arimura, A.; Kikuchi, M. *J Biol Chem*, **1994**, *269*, 1290-3.
- [77] Brisson, G. R.; Malaisse-Lagae, F.; Malaisse, W. J. *J Clin Invest*, **1972**, *51*, 232-41.
- [78] Furman, B.; Ong, W. K.; Pyne, N. J. *Adv Exp Med Biol*, **2010**, *654*, 281-304.
- [79] Yao, X.; Kwan, H. Y.; Huang, Y. *Neurosignals*, **2005**, *14*, 273-80.
- [80] Togashi, K.; Hara, Y.; Tominaga, T.; Higashi, T.; Konishi, Y.; Mori, Y.; Tominaga, M. *EMBO J*, **2006**, *25*, 1804-15.
- [81] De Petrocellis, L.; Starowicz, K.; Moriello, A. S.; Vivese, M.; Orlando, P.; Di Marzo, V. *Exp Cell Res*, **2007**, *313*, 1911-20.
- [82] Linte, R. M.; Ciobanu, C.; Reid, G.; Babes, A. *Exp Brain Res*, **2007**, *178*, 89-98.
- [83] Abe, J.; Hosokawa, H.; Sawada, Y.; Matsumura, K.; Kobayashi, S. *Neurosci Lett*, **2006**, *397*, 140-4.
- [84] Premkumar, L. S.; Raisinghani, M.; Pingle, S. C.; Long, C.; Pimentel, F. *J Neurosci*, **2005**, *25*, 11322-9.
- [85] Bavencoffe, A.; Gkika, D.; Kondratskiy, A.; Beck, B.; Borowiec, A. S.; Bidaux, G.; Busserolles, J.; Eschaliere, A.; Shuba, Y.; Skryma, R.; Prevarskaya, N. *J Biol Chem*, **2010**, *285*, 9410-9.
- [86] Suzuki, Y.; Zhang, H.; Saito, N.; Kojima, I.; Urano, T.; Mogami, H. *J Biol Chem*, **2006**, *281*, 28499-507.
- [87] Persaud, S. J.; Jones, P. M.; Howell, S. L. *Biochem J*, **1993**, *289* (Pt 2), 497-501.
- [88] Thams, P.; Capito, K.; Hedeskov, C. J. *Biochem J*, **1988**, *253*, 229-34.
- [89] Arkhammar, P.; Juntti-Berggren, L.; Larsson, O.; Welsh, M.; Nånberg, E.; Sjöholm, A.; Kohler, M.; Berggren, P. O. *J Biol Chem*, **1994**, *269*, 2743-9.
- [90] Gilon, P.; Henquin, J. C. *Endocr Rev*, **2001**, *22*, 565-604.
- [91] Guinamard, R.; Demion, M.; Launay, P. *Physiology (Bethesda)*, **2010**, *25*, 155-64.
- [92] Nilius, B.; Prenen, J.; Tang, J.; Wang, C.; Owsianik, G.; Janssens, A.; Voets, T.; Zhu, M. X. *J Biol Chem*, **2005**, *280*, 6423-33.
- [93] Earley, S.; Straub, S. V.; Brayden, J. E. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **2007**, *292*, H2613-22.
- [94] Cheng, H.; Yibchok-Anun, S.; Park, S. C.; Hsu, W. H. *Biochem J*, **2002**, *364*, 33-9.
- [95] Wollheim, C. B.; Dunne, M. J.; Peter-Riesch, B.; Bruzzone, R.; Pozzan, T.; Petersen, O. H. *EMBO J*, **1988**, *7*, 2443-9.
- [96] Light, P. E.; Bladen, C.; Winkfein, R. J.; Walsh, M. P.; French, R. J. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2000**, *97*, 9058-63.
- [97] Beguin, P.; Nagashima, K.; Nishimura, M.; Gonoï, T.; Seino, S. *EMBO J*, **1999**, *18*, 4722-32.
- [98] Chang, T. J.; Chen, W. P.; Yang, C.; Lu, P. H.; Liang, Y. C.; Su, M. J.; Lee, S. C.; Chuang, L. M. *Diabetologia*, **2009**, *52*, 1112-21.
- [99] Reichardt, L. F. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **2006**, *361*, 1545-64.
- [100] Rosenbaum, T.; Vidaltamayo, R.; Sanchez-Herrera, D.; Hiriart, M. *J Membr Biol*, **1996**, *153*, 53-8.
- [101] Vidaltamayo, R.; Sanchez-Soto, M. C.; Rosenbaum, T.; Martinez-Merlos, T.; Hiriart, M. *Endocrine*, **1996**, *4*, 19-26.
- [102] Gonzalez del Pliego, M.; Aguirre-Benitez, E.; Sanchez-Soto, M. C.; Larrieta, M. E.; Velazquez-Carranza, A.; Vidaltamayo, R.; Meza-Mora, M.; Zepeda-Rodriguez, A.; Hernandez-Falcon, J.; Hiriart, M. *Cell Tissue Res*, **2001**, *305*, 365-78.
- [103] Hiriart, M.; Vidaltamayo, R.; Sanchez-Soto, M. C. *Isr Med Assoc J*, **2001**, *3*, 114-6.
- [104] Rosenbaum, T.; Castanares, D. T.; Lopez-Valdes, H. E.; Hiriart, M. *J Membr Biol*, **2002**, *186*, 177-84.
- [105] Vidaltamayo, R.; Sanchez-Soto, M. C.; Hiriart, M. *FASEB J*, **2002**, *16*, 891-2.
- [106] Vidaltamayo, R.; Mery, C. M.; Angeles-Angeles, A.; Robles-Diaz, G.; Hiriart, M. *Growth Factors*, **2003**, *21*, 103-7.
- [107] Navarro-Tableros, V.; Sanchez-Soto, M. C.; Garcia, S.; Hiriart, M. *Diabetes*, **2004**, *53*, 2018-23.
- [108] Larrieta, M. E.; Vital, P.; Mendoza-Rodriguez, A.; Cerbon, M.; Hiriart, M. *Exp Biol Med (Maywood)*, **2006**, *231*, 396-402.
- [109] Navarro-Tableros, V.; Fiordelisio, T.; Hernandez-Cruz, A.; Hiriart, M. *Channels (Austin)*, **2007**, *1*, 408-16.
- [110] Cabrera-Vasquez, S.; Navarro-Tableros, V.; Sanchez-Soto, M. C.; Gutierrez-Ospina, G.; Hiriart, M. *BMC Dev Biol*, **2009**, *9*, 34.
- [111] Yamazaki, H.; Zawalich, K. C.; Zawalich, W. S. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, **2010**, *56*, 1-8.
- [112] Aoyagi, K.; Ohara-Imaizumi, M.; Nishiwaki, C.; Nakamichi, Y.; Nagamatsu, S. *Biochem J*, **2010**, *432*, 375-86.
- [113] Shu, X.; Mendell, L. M. *J Neurophysiol*, **2001**, *86*, 2931-8.
- [114] Zhu, W.; Oxford, G. S. *Mol Cell Neurosci*, **2007**, *34*, 689-700.
- [115] Rosenbaum, T.; Simon, S. A. In: *Liedtke WB, Heller S, editors. TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades. Boca Raton (FL): CRC Press, 2007.*
- [116] Stein, A. T.; Ufret-Vincenty, C. A.; Hua, L.; Santana, L. F.; Gordon, S. E. *J Gen Physiol*, **2006**, *128*, 509-22.
- [117] Zhang, X.; Huang, J.; McNaughton, P. A. *EMBO J*, **2005**, *24*, 4211-23.
- [118] Van Buren, J. J.; Bhat, S.; Rotello, R.; Pauza, M. E.; Premkumar, L. S. *Mol Pain*, **2005**, *1*, 17.
- [119] Larque, C.; Velasco, M.; Navarro-Tableros, V.; Duhne, M.; Aguirre, J.; Gutierrez-Reyes, G.; Moreno, J.; Robles-Diaz, G.; Hong, E.; Hiriart, M. *IUBMB Life*, **2011**, *63*, 831-9.
- [120] Zhang, W.; Tong, Q.; Conrad, K.; Wozney, J.; Cheung, J. Y.; Miller, B. A. *Am J Physiol Cell Physiol*, **2007**, *292*, C1746-58.
- [121] Ketterer, C.; Mussig, K.; Heni, M.; Dudziak, K.; Randrianarisoa, E.; Wagner, R.; Machicao, F.; Stefan, N.; Holst, J. J.; Fritsche, A.; Haring, H. U.; Staiger, H. *Metabolism*, **2011**, *60*, 1325-33.
- [122] Ahren, B. *Nat Rev Drug Discov*, **2009**, *8*, 369-85.
- [123] Diaz-Villasenor, A.; Sanchez-Soto, M. C.; Cebrian, M. E.; Ostrosky-Wegman, P.; Hiriart, M. *Toxicol Appl Pharmacol*, **2006**, *214*, 30-4.
- [124] Hamill, O. P.; Marty, A.; Neher, E.; Sakmann, B.; Sigworth, F. J. *Pflügers Arch*, **1981**, *391*, 85-100.
- [125] Xue, Y.; Ren, J.; Gao, X.; Jin, C.; Wen, L.; Yao, X. *Mol Cell Proteomics*, **2008**, *7*, 1598-608.

Received: April 04, 2012

Revised: October 15, 2012

Accepted: October 16, 2012

DISCLAIMER: The above article has been published in Epub (ahead of print) on the basis of the materials provided by the author. The Editorial Department reserves the right to make minor modifications for further improvement of the manuscript.

## Supplemental Material

# TRPM Channels Phosphorylation as a Potential Bridge Between Old Signals and Novel Regulatory Mechanisms of Insulin Secretion

Diaz-Garcia, Carlos Manlio<sup>1,2</sup>, Sanchez-Soto<sup>1</sup>, Carmen and Hiriart, Marcia<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. División de Neurociencias, Departamento de Neurodesarrollo y Fisiología. Ciudad Universitaria, Circuito Ext. UNAM, Coyoacán, México DF. CP 04510, México*

<sup>2</sup>*Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM*

### K) SUPPLEMENTAL MATERIAL (METHODS)

**Primary culture of pancreatic  $\beta$ -cells:** Pancreatic  $\beta$ -cells were obtained following the technique previously described [123]. All procedures were approved by the Animal Care Committee of the Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Animal care was performed according to the "International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals", Council for International Organizations of Medical Sciences, 2010). Wistar rats (250-280 g) were obtained from the local animal facility, maintained in a 14:10-h light-dark cycle (0600 – 2000), and allowed free access to standard laboratory rat diet and tap water. On the day of the experiments, animals were anesthetized with intraperitoneal pentobarbital sodium (40 mg/kg), and, after pancreas dissection, animals were killed by cervical dislocation.

Islets were separated from the rest of pancreatic tissue by collagenase digestion and a Ficoll gradient centrifugation; clean islets were then handpicked. Dissociation of the cells was achieved by incubating them in a shaker bath for 10 min at 37°C in calcium-free Spinner solution, with 15.6 mM glucose, 0.5% bovine serum albumin, and 0.01% trypsin, followed by mechanical disruption. Single cells were cultured for 1 day in RPMI-1640 supplemented with 10% fetal calf serum, 200 units/ml penicillin G, 200 mg/ml streptomycin, and 0.5 mg/ml amphotericin B.

**Electrophysiology:** Whole cell patch-clamp recordings [124] were performed at room temperature of 22-23 °C using an Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA). An Ag-AgCl wire was used as a reference electrode. Patch electrodes were pulled from Kimax-51 capillary tubes (Kimble Glass, Vineland, NJ) and had a tip resistance of 2 - 4 M $\Omega$ . Electrode tips were coated with Sylgard (Dow Corning, Midland, MI) or dental wax to reduce pipette stray capacitance. After whole cell configuration was assessed, series resistance was electronically compensated by approximately a 70%, resulting in uncompensated series resistance lesser than twice the pipette resistance, which causes an IV drop error < 2%.  $\beta$ -cells capacitance was 6.5  $\pm$  0.2 pF (N=50) and only patches with stable gigaseals were analyzed. Currents were filtered at 2 kHz and digitized at 100  $\mu$ s intervals. Pulse generation and data acquisition were performed by the PClamp software version 8 (Axon Instruments). CAN currents were elicited by voltage ramps of 0.5 mV/ms slope, from a holding potential of -80 mV to a final voltage command of 80 mV.

**Solutions:** Extracellular solution contained (mM): 140 NaCl, 10 HEPES, 5 MgCl<sub>2</sub>, 10 Glucose and 100 nM TTX; pH = 7.4 and 285-295 mOsm/kg. Intracellular solution contained (mM): 140 NaCl, 10 HEPES, 0.25 EDTA and proper amounts of MgCl<sub>2</sub> and CaCl<sub>2</sub> for 1 mM and 1 - 500  $\mu$ M of free Mg<sup>+2</sup> and Ca<sup>2+</sup> respectively (calculated using WEBMAXC v2.10, URL: maxchelator.stanford.edu); pH = 7.2 and 275-280 mOsm/kg. For some experiments, Na<sup>+</sup> was replaced with the non permeating cation NMDG<sup>+</sup>. For the isometric solutions the junction potential ( $\leq$  1 mV) was not corrected.

**Bioinformatics:** The search for phosphorylation sites was conducted online (<http://gps.biocuckoo.org/online.php>) according to a previously described algorithm [125].