



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**CARACTERIZACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA DE LOS CANALES DE SODIO
SENSIBLES A VOLTAJE EN CÉLULAS β PANCREÁTICAS DE RATA CON
SÍNDROME METABÓLICO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
EVERARDO RUIZ MORA

TUTOR PRINCIPAL
DRA. MARCIA HIRIART URDANIVIA
[Instituto de Fisiología Celular](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DR. JUAN CARLOS GÓMORA MARTÍNEZ
[Instituto de Fisiología Celular](#)

DR. DAVID ERASMO GARCÍA DÍAZ
[Facultad de Medicina](#)

Ciudad de México. Octubre, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos académicos

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de la Dra. Marcia Hiriart Urdanivia, de la división de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México.

Se agradece el financiamiento otorgado por el Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACyT) por los donativos para la realización del proyecto CB-253222 y a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-PAPIIT) por los donativos para el proyecto IN210817 e IV100116, de los cuales este trabajo forma parte y que fueron otorgados a la Dra. Marcia Hiriart.

Se agradece al CONACyT por la beca de formación de posgrado de excelencia, inscrita bajo el número 766410.

Tabla de contenido

RESUMEN	1
ABREVIATURAS	3
INTRODUCCIÓN	4
Generalidades del páncreas	4
Células β e insulina	4
Secreción de insulina estimulada por glucosa	5
Metabolismo de la glucosa	7
Actividad eléctrica de las células β	8
Exocitosis de los gránulos que contienen insulina	11
Generalidades de los canales de sodio sensibles a voltaje (Na_v)	11
Estructura molecular	11
Clasificación	14
Farmacología	15
Inhibición de canales de sodio con toxinas	16
Regulación endógena	17
Canales de sodio sensibles a voltaje en las células β	18
Síndrome metabólico	20
Fisiopatología del síndrome metabólico	21
Alteraciones en las células β	22
Modelos animales para el estudio del síndrome metabólico	24
ANTECEDENTES AL PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA	26
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
HIPÓTESIS	28
OBJETIVO GENERAL	29
OBJETIVOS PARTICULARES	29
METODOLOGÍA	30
Diseño experimental	30
Modelo animal	31
Cuantificación de niveles plasmáticos de insulina y triglicéridos	32
Pruebas intraperitoneales de tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina . 32	
Aislamiento y cultivo de células β pancreáticas	32

Electrofisiología de las células β	33
Soluciones de registro	35
Ensayo hemolítico inverso	35
Inmunofluorescencia de la subunidad $\alpha 1.7$ del canal de sodio	36
Análisis estadístico	37
RESULTADOS	38
Caracterización del modelo	38
Caracterización de las corrientes de sodio sensibles a voltaje	41
Densidad de corriente de Na^+	41
Dependencia de voltaje de la activación	43
Inactivación de estado estacionario	43
Participación de las corrientes de sodio en la secreción de insulina estimulada por glucosa	46
Índice de secreción	46
Área de la inmunoplaca	47
Distribución por frecuencia del área promedio de las inmunoplacas	49
Fracción de células secretoras	51
Cuantificación de la presencia de los canales de sodio en las células β	52
Efectos del síndrome metabólico sobre las corrientes de calcio	53
Densidad de corriente de calcio	53
Participación de las corrientes de Ca^{2+} en la secreción de insulina estimulada por glucosa	56
Índice de secreción	56
Área de la inmunoplaca	57
Distribución por frecuencia del área promedio de las inmunoplacas	59
Fracción de células secretoras	61
Tamaño de las células β pancreáticas	62
DISCUSIÓN	64
CONCLUSIONES	74
REFERENCIAS	75

RESUMEN

El síndrome metabólico se define como el grupo de signos que incrementan el riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo 2 y enfermedades cardiovasculares. Diversos estudios han mostrado que durante el síndrome metabólico se presenta una mayor secreción de insulina por parte de las células β pancreáticas. El proceso de secreción de insulina estimulada por glucosa es un proceso complejo en el que participan diferentes canales iónicos, entre los que destacan los canales de K^+ regulados por ATP (K_{ATP}), canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje (Ca_v^{2+}) y los canales de Na^+ sensibles a voltaje (Na_v^+).

Previamente, estudios realizados por nuestro equipo de trabajo observaron que el síndrome metabólico provoca una mayor sensibilidad al ATP por parte de los canales K_{ATP} y una mayor variabilidad en las corrientes de Ca^{2+} . Tales cambios explican parcialmente el aumento en la secreción de insulina observada. Sin embargo, los efectos del síndrome metabólico sobre los canales de Na_v^+ no han sido analizados. Por lo tanto, en este trabajo nos interesó analizar el efecto del síndrome metabólico sobre la actividad de los canales Na_v^+ en las células β .

Desarrollamos un modelo animal de las primeras etapas del síndrome metabólico, el cual consistió en la administración de sacarosa al 20% por un periodo de 8 semanas a ratas de la cepa Wistar con un peso de alrededor de 250g. Caracterizamos electrofisiológicamente las corrientes de sodio en células beta con y sin síndrome metabólico, así como la participación de dichas corrientes en el proceso de secreción de insulina.

Entre los principales resultados observamos que hay un aumento en la secreción de insulina en las células beta de animales con síndrome metabólico. Sin embargo, este aumento no se relaciona con algún cambio en las corrientes de sodio, ni con la expresión de los canales de sodio. Complementario a esto, analizamos las corrientes de calcio en las que pudimos observar un aumento en aquellas correspondientes a células beta con síndrome metabólico.

En conclusión, durante las primeras etapas del síndrome metabólico, este no tiene efectos sobre los canales de sodio sensibles a voltaje y, por lo tanto, estos canales no forman parte del mecanismo que explique el aumento en la secreción de insulina observada en este trabajo. Esta última condición puede estar relacionada más a cambios en las corrientes de calcio, por lo que se necesita mayor investigación.

ABSTRACT

The Metabolic syndrome is defined as the group of signs that increase the risk to develop type 2 Diabetes mellitus and cardiovascular diseases. Diverse studies have showed that during Metabolic syndrome a higher insulin secretion is present in pancreatic beta cells. The glucose stimulated insulin secretion is a complex process, in which a variety of ion channels participate, e. g. ATP-sensitive potassium channel (K_{ATP}), voltage-gated calcium channels (Ca_v^{2+}) and voltage-gated sodium channels (Na_v^+).

Previously, studies done by our group demonstrated that Metabolic syndrome causes higher ATP sensitivity in K_{ATP} channels and a greater variability on calcium currents. Those changes partly explain the observed increased insulin secretion. However, the effects of metabolic syndrome on voltage-gated sodium channels have not been analyzed. Therefore, in this work we were interested in analyzing the effects of metabolic syndrome on sodium channels activity from pancreatic beta cells.

We developed an animal model of the first stages of metabolic syndrome, which consisted in 20% sucrose administration for 8 weeks to male Wistar rats with a weight around 250g. We electrophysiologically characterized sodium currents in pancreatic beta cells with/without metabolic syndrome and their participation in the insulin secretion process.

We mainly observed an increase in insulin secretion of pancreatic beta cells with metabolic syndrome. However, this increase is not related with neither changes on sodium currents nor with sodium channel protein expression. Complementary to this, we analyzed calcium currents, in which we could observe an increase in cells from animals with metabolic syndrome.

In conclusion, during first stages of metabolic syndrome, this does not have any effects on voltage-gated sodium channels and, therefore, these channels are not part of the mechanism that explain the observed increase in insulin secretion. On the other hand, this last condition could be related to changes on calcium current, for that reason more research is needed.

ABREVIATURAS

ADP	Adenosin Difosfato
ATP	Adenosin Trifosfato
CaV	Canales de Calcio Dependientes de Voltaje
EGTA	Ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N'-tetraacético
DAPI	4', 6-diamino 2-indol
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción ligado a enzima
G6P	Glucosa 6-Fosfato
GLUT 1	Transportador de Glucosa 1
GLUT 2	Transportador de Glucosa 2
GLUT-4	Transportador de Glucosa 4
GRD	Ganglio de la raíz dorsal
HDL	Lipoproteína de Alta Densidad
IL-6	Interleucina 6
IRS	Sustrato del receptor de Insulina
ka	Pendiente de Activación
ki	Pendiente de inactivación
KATP	Canales de Potasio Sensibles a ATP
Kca	Canales de Potasio Dependientes de Voltaje y sensibles a calcio
Km	Constante de Michaelis-Menten
KV	Canales de Potasio Dependientes de Voltaje
LP	Placas grandes
NaV	Canales de Sodio Sensibles a Voltaje
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinasa
PKA	Proteína Cinasa A
PKC	Proteína Cinasa C
r.p.m	Revoluciones Por Minuto
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
SP	Placas pequeñas
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral α
TRP	Canales de Potencial Receptor Transitorio
TTX	Tetrodotoxina
UI	Unidades Internacionales
Va0.5	Voltaje en el cual el 50% de los canales están activados
Vi0.5	Voltaje en el cual el 50% de los canales están inactivados

INTRODUCCIÓN

Generalidades del páncreas

El páncreas es una glándula mixta compuesta por dos componentes celulares principales: exócrino y endócrino. La parte exocrina del páncreas constituye poco más del 98% de la masa pancreática, su función principal es la producción y secreción de enzimas destinadas a la digestión de nutrientes (Jouvet and Estall, 2017). Mientras que, cerca del 1 al 2% de la masa pancreática corresponde al componente endocrino, el cual está constituido por acúmulos celulares dispersos a través del componente exocrino, denominados islotes pancreáticos (Murtaugh and Melton, 2003).

Los islotes pancreáticos están formados por 5 tipos celulares, que de acuerdo a la hormona que sintetizan y secretan se conocen como células δ (somatostatina), células PP (polipéptido pancreático), células ϵ (grelina), células α (glucagon) y células β (insulina) (Steiner *et al.*, 2010).

La principal función de los islotes pancreáticos es la secreción hormonal que regula el metabolismo de los nutrientes (Brereton *et al.*, 2015), de entre las cuales destaca la insulina, importante en la regulación de la homeostasis de la glucosa sanguínea en el organismo.

Células β e insulina

Desde su descubrimiento por Banting, Best, Collip y Macleod en 1921 hasta la actualidad, la insulina ha sido un tema profundamente estudiado (Steiner, 2011; Ward and Lawrence, 2011). Las células β representan cerca del 60 – 80% del número total de células que conforman al islote pancreático de roedores, por lo que son el tipo celular predominante. Las células β se caracterizan por ser las únicas en el organismo capaces de sintetizar y secretar insulina (Murtaugh and Melton, 2003).

En promedio las células β tienen un diámetro de 10 – 15 μm y se ha estimado que cada célula contiene aproximadamente 20 pg de insulina (Piro *et al.*, 2016) distribuida en 10 000 gránulos, cuyos diámetros promedio son de 300 nm (Olofsson *et al.*, 2002). Una célula β adulta puede liberar aproximadamente de 30 – 70 UI de insulina por día, de la cual un 50 % es secretada bajo condiciones no estimulantes de glucosa (Piro *et al.*, 2016).

La insulina es una proteína conformada por 51 residuos de aminoácidos organizados en dos cadenas polipeptídicas: una cadena A y una cadena B de 21 y 30 residuos de aminoácidos, respectivamente y unidas entre sí por dos enlaces disulfuro. Adicionalmente, existe otro enlace disulfuro intracatenario en la cadena A. Una vez que la insulina ha sido secretada por las células β hacia la circulación, esta inicia sus efectos anabólicos a través de la unión con su receptor transmembranal.

Los principales efectos de la insulina son promover el transporte de glucosa por parte de las células del tejido muscular y adiposo después de la ingesta de alimentos y regular el almacenamiento de carbohidratos, lípidos y proteínas en el hígado, tejido adiposo y músculo (Hiriart and Aguilar-Bryan, 2008).

Secreción de insulina estimulada por glucosa

Existe una gran cantidad de secretagogos de insulina. Algunos de ellos incluyen a los ácidos grasos, aminoácidos, incretinas, hormonas y nucleótidos (Keane and Newsholme, 2014; Newsholme *et al.*, 2014; Regazzi *et al.*, 2016). Sin embargo, hoy en día es ampliamente reconocido que la glucosa es el estimulante más potente y, por ende, es el mejor estudiado (Velasco *et al.*, 2016).

El proceso de secreción de insulina estimulada por glucosa es un proceso complejo en el que el estímulo químico de la glucosa se acopla con el metabolismo y modula la actividad eléctrica de la célula β , la cual provoca un aumento de la concentración intracelular de calcio, culminando con la exocitosis de los gránulos que contienen insulina (Hiriart and Aguilar-Bryan, 2008).

En condiciones basales de glucosa (5 – 6 mM) la membrana de las células β se encuentra polarizada en un potencial de reposo de alrededor de -60 a -80 mV, en el cual se presenta una secreción de insulina basal. Sin embargo, después de la ingesta de alimentos la concentración extracelular de glucosa incrementa por arriba de 7 mM, lo que genera un aumento en la excitabilidad de la célula y conlleva a una mayor secreción de insulina (Hiriart and Aguilar-Bryan, 2008).

La secreción de insulina estimulada por glucosa es pulsátil y presenta dos fases. La primera se caracteriza por ser robusta y rápida, ocurre durante los primeros 5 – 10 minutos posteriores al aumento de la concentración extracelular de glucosa. Mientras que, la segunda fase es menos robusta que la primera, sin embargo es sostenida hasta que se restaura la glucemia basal (Hiriart and Aguilar-Bryan, 2008; Velasco *et al.*, 2016).

Dado que la secreción de insulina puede durar horas, durante la segunda fase de este proceso se secreta la mayor cantidad de insulina. Durante una hora de estimulación con glucosa, aproximadamente 85% de la insulina secretada corresponde a la segunda fase, mientras que el porcentaje restante corresponde a la insulina secretada durante la primera fase (Henquin *et al.*, 2015).

Existe controversia acerca de los mecanismos que expliquen las dos fases. Se ha propuesto que la primera fase se debe a la exocitosis de gránulos preensamblados a la membrana plasmática, conocidos como “gránulos listos para liberarse” (readily releasable pool). Mientras que la segunda fase se debe al reclutamiento y exocitosis de un grupo de gránulos conocidos como “gránulos de reserva” (Velasco *et al.*, 2016; Boland *et al.*, 2017).

Alternativamente, se ha propuesto que el aumento en el calcio intracelular de la célula β causado por la glucosa, conocida como vía iniciadora (previamente "vía dependiente de los canales K_{ATP} "), es el mecanismo responsable de la primera fase de la secreción de insulina. Mientras que señales adicionales generadas por el metabolismo de la glucosa, conocidas como vía amplificadora metabólica

(previamente “vía independiente de los canales K_{ATP} ”) explican la segunda fase del proceso de secreción (Newsholme *et al.*, 2014; Kalwat and Cobb, 2017).

Metabolismo de la glucosa

Durante el proceso de secreción de insulina estimulada por glucosa se lleva a cabo el acoplamiento entre un mayor metabolismo de la glucosa con la actividad eléctrica de distintos canales iónicos, siendo el componente metabólico el primero en tener lugar durante dicho proceso (figura 1).

Primero, la glucosa es internalizada hacia la célula β a través del transportador de glucosa GLUT2 en roedores ($K_m = 11$ mM) o a través del GLUT1 en humanos ($K_m = 6$ mM) (McCulloch *et al.*, 2017). Como puede notarse la K_m de estos transportadores es alta, por lo cual estos transportadores pueden aumentar su actividad en respuesta a aumentos en la concentración extracelular de glucosa, como sucede en condiciones posprandiales (Newsholme *et al.*, 2014).

Posteriormente, la glucosa es fosforilada a glucosa-6 fosfato por actividad de la glucocinasa. Esta reacción es considerada como el paso limitante en el metabolismo de la glucosa y con la cual se asegura la oxidación de este nutriente a través de glucólisis, ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa generando un aumento en la relación de ATP/ADP intracelular (Hiriart *et al.*, 2014).

El aumento en la relación ATP/ADP intracelular da inicio a una cascada de eventos electroquímicos en la célula β que conllevan a un aumento en la concentración intracelular de calcio y a la exocitosis de los gránulos que contienen insulina. Por lo tanto, un mayor metabolismo de la glucosa causado por un aumento en la concentración extracelular de este nutriente determina la cantidad de insulina a secretar (Hiriart and Aguilar-Bryan, 2008; Velasco *et al.*, 2016).

Actividad eléctrica de las células β

Como se muestra en la figura 1, la actividad eléctrica de las células β es generada por la actividad de al menos seis diferentes tipos de canales iónicos: 1) los canales de potasio sensibles a ATP (K_{ATP}); 2) los canales de potencial receptor transitorio (TRP); 3) los canales de sodio sensibles a voltaje (Na_v); 4) los canales de calcio dependientes de voltaje (Ca_v); 5) los canales de potasio dependientes de voltaje (K_v) y 6) los canales de potasio dependientes de voltaje y sensibles a calcio (K_{Ca}) (Velasco *et al.*, 2016).

En condiciones de reposo, la membrana plasmática de la célula β es más permeable a iones potasio que a otros iones. La conductancia a iones potasio ($\sim 20 - 30$ pS) establece el potencial de membrana en reposo de la célula β cercano al potencial de equilibrio de potasio, es decir cercano a los -80 mV (Yang *et al.*, 2014; Velasco *et al.*, 2016).

Durante la secreción de insulina estimulada por glucosa, el aumento en la relación ATP/ADP intracelular genera el cierre de los canales K_{ATP} , evitando el flujo de los iones potasio e iniciando una lenta despolarización del potencial de membrana de la célula β (Proks and Clark, 2015). Sin embargo, esta despolarización no es suficiente para alcanzar el umbral a partir del cual se disparen potenciales de acción que culminen con la exocitosis de los gránulos de insulina (Yang *et al.*, 2014).

Complementario al cierre de los canales K_{ATP} , se ha propuesto que la actividad de los canales catiónicos no selectivos del tipo potencial receptor transitorio, mejor conocidos como canales TRP, también es importante en el proceso de secreción de insulina (Hiriart and Aguilar-Bryan, 2008).

De las siete familias de canales TRP que se han descrito (TRPC, canónica; TRPV, vaniloide; TRPM, melastatina; TRPP, policistina; TRPML, mucolipina; TRPA, anquirina; y TRPN) se ha reportado que la célula β pancreática expresa canales de únicamente 3 familias: TRPC, TRPM Y TRPV (Colsoul, Vennekens and Nilius, 2011).

El influjo de cationes a través de dichos canales provoca una mayor despolarización del potencial de membrana hasta alcanzar valores cercanos a los -40 mV, en los cuales se aumenta la probabilidad de apertura de los canales de sodio y calcio tipo T dependientes de voltaje (Hiriart and Aguilar-Bryan, 2008).

El influjo de sodio y calcio a través de dichos canales genera una mayor despolarización del potencial de membrana hasta alcanzar un potencial cercano a los -20 mV, en el cual se aumenta la probabilidad de apertura de los canales de calcio tipo L dependientes de voltaje (Hiriart *et al.*, 2014).

Los canales de calcio tipo L, sensibles a dihidropiridinas, son responsables del 60 – 80% de la secreción de insulina estimulada por glucosa en roedores (Yang *et al.*, 2014), por lo que son consideradas como el flujo de calcio más importante en dicho proceso (Hiriart and Aguilar-Bryan, 2008). Adicionalmente, los canales de calcio tipo P/Q son el segundo tipo más importante en roedores, aunque en el humano pueden ser igual de importantes que los tipo L (Yang *et al.*, 2014).

Finalmente, en respuesta a la despolarización del potencial de membrana y al aumento de la concentración de calcio intracelular se activan los canales de potasio sensibles a voltaje (K_v) y los canales de potasio activados por calcio (K_{Ca}), lo cual repolariza el potencial de membrana de la célula β , disminuyendo la secreción de insulina (Hiriart and Aguilar-Bryan, 2008; Yang *et al.*, 2014).

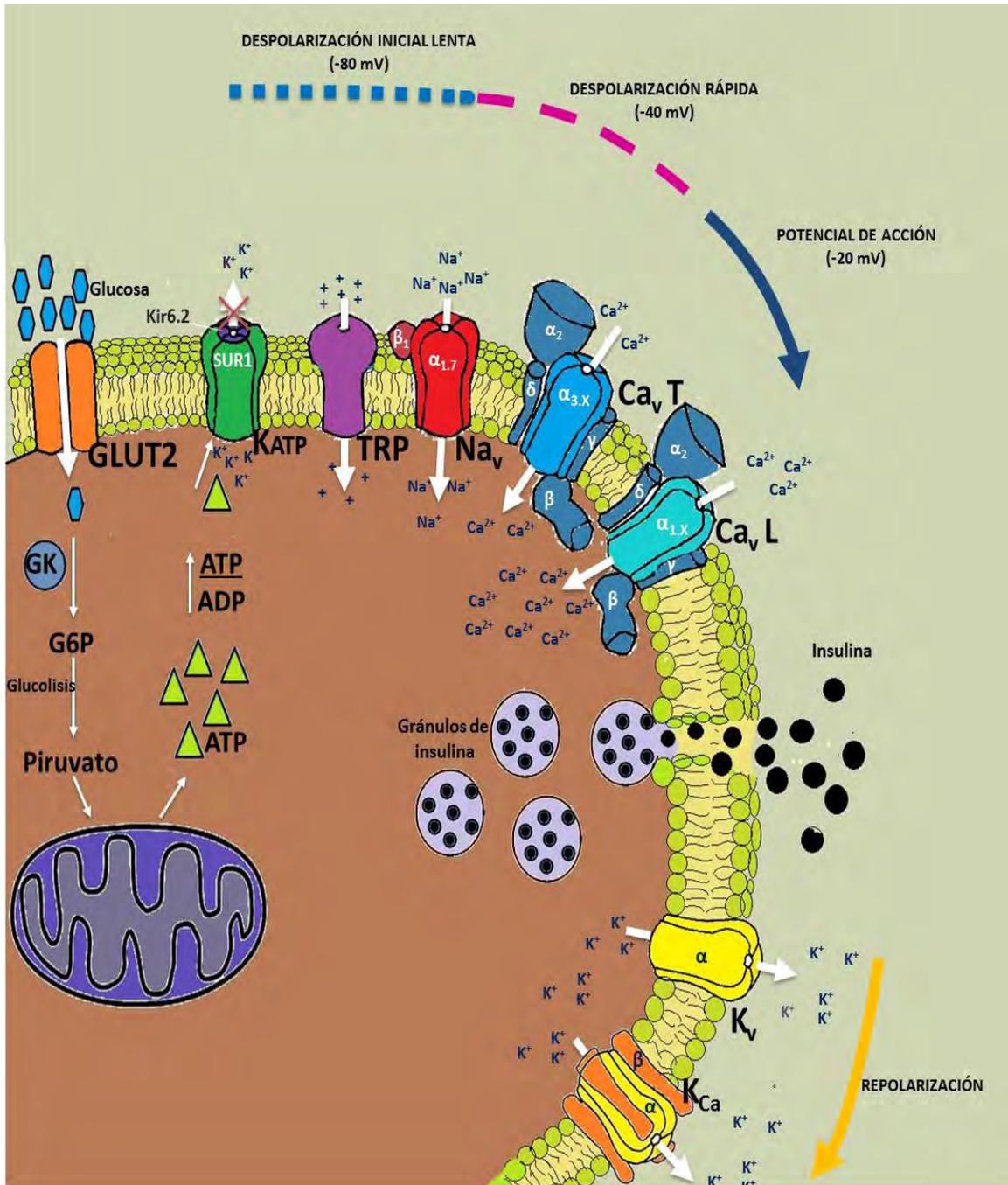


Figura 1. Proceso de secreción de insulina estimulada por glucosa. La glucosa es internalizada hacia la célula β a través del transportador GLUT2 y fosforilada a glucosa 6 fosfato por la glucocinasa. La oxidación de este nutriente provoca un aumento en la relación ATP/ADP intracelular, conllevando al cierre de los canales KATP e iniciando una despolarización lenta del potencial de membrana, en la cual también participan los canales TRPs. La participación conjunta de estos canales provoca una mayor despolarización, la cual aumenta la probabilidad de apertura de los canales de sodio y calcio tipo T hasta un potencial de -20mV, potencial en que se abren los canales de calcio tipo L. La apertura de estos últimos genera un aumento en la concentración intracelular de calcio, señal que desencadena la fusión de los granulos de insulina con la membrana plasmática. Finalmente, en respuesta a la despolarización del potencial de membrana y al aumento de la concentración de calcio intracelular se activan los canales de potasio sensibles a voltaje (Kv) y los canales de potasio activados por calcio (KCa), lo cual repolariza el potencial de membrana de la célula (figura original).

Exocitosis de los gránulos que contienen insulina

Como se mencionó anteriormente, la apertura de los canales de calcio sensibles a voltaje durante el proceso de secreción de insulina estimulada por glucosa provoca un incremento en la concentración intracelular de calcio. En respuesta a este incremento, los gránulos que contienen insulina se fusionan con la membrana plasmática de la célula β (Hou *et al.*, 2009).

El influjo de calcio se acopla a la exocitosis de los gránulos que contienen insulina por medio de una familia de proteínas localizada en la membrana plasmática de las células β , las sinaptotagminas. Dichas proteínas interactúan con proteínas del complejo SNARE, el cual está formado por las proteínas syntaxina 1 y SNAP25/23 en la membrana plasmática, por la proteína VAMP2 en los gránulos que contienen insulina y por proteínas accesorias (Munc18, Munc13, Rab) (Wang and Thurmond, 2009).

En respuesta a la elevación de la concentración intracelular de calcio, la interacción entre las sinaptotagminas con proteínas del complejo SNARE conlleva a la formación de un complejo molecular altamente estable que permite la fusión entre las membranas de los gránulos que contienen insulina con la membrana plasmática, liberándose la insulina al espacio extracelular (Ro der *et al.*, 2016).

Generalidades de los canales de sodio sensibles a voltaje (Na_v)

Estructura molecular

Como se muestra en la figura 2, los canales de sodio sensibles a voltaje son proteínas heteroméricas compuestas por una subunidad α , encargada de formar el poro, y por una o dos subunidades β , las cuales modulan la actividad y la expresión en membrana celular de la subunidad α (Catterall, 2012; Namadurai *et al.*, 2015).

La subunidad α de los canales de sodio está formada por aproximadamente 2000 residuos de aminoácidos organizados en 4 dominios homólogos (I – IV) pero no idénticos, cada uno con seis segmentos transmembranales (S1 – S6), para dar un peso de aproximadamente 260 kDa (figura 2) (Catterall, 2012; Kruger and Isom, 2016).

Similar a otros canales de la superfamilia de los canales sensibles a voltaje, cada dominio de los canales de sodio tiene un segmento S4 capaz de sensor los cambios de voltaje. Esto debido a la presencia de 4 – 8 motivos repetidos que consisten en un residuo de aminoácido cargado, usualmente de arginina, seguido por dos residuos hidrofóbicos (Catterall, 2012).

Los segmentos S5 y S6 de cada dominio están unidos por cadenas de residuos de aminoácidos, denominadas como giros P, en las cuales se encuentra el filtro de selectividad del canal (Catterall, 2012). Se ha propuesto que el filtro de selectividad se localiza en la parte más profunda del giro P y se constituye por una secuencia conservada de 4 residuos de aminoácido: ácido aspártico, ácido glutámico, lisina y alanina (Zakon, 2012; Kwong and Carr, 2015).

Sin embargo, una particularidad estructural de los canales de sodio con respecto a otros canales sensibles a voltaje es la evolución del segmento intracelular que conecta a los dominios III y IV como una “compuerta de inactivación” (Zakon, 2012). Esta compuerta de inactivación sirve como una partícula bloqueadora intracelular del canal, ya que puede plegarse hacia el poro poco después de la apertura del canal, generando una inactivación rápida (Catterall, 2014).

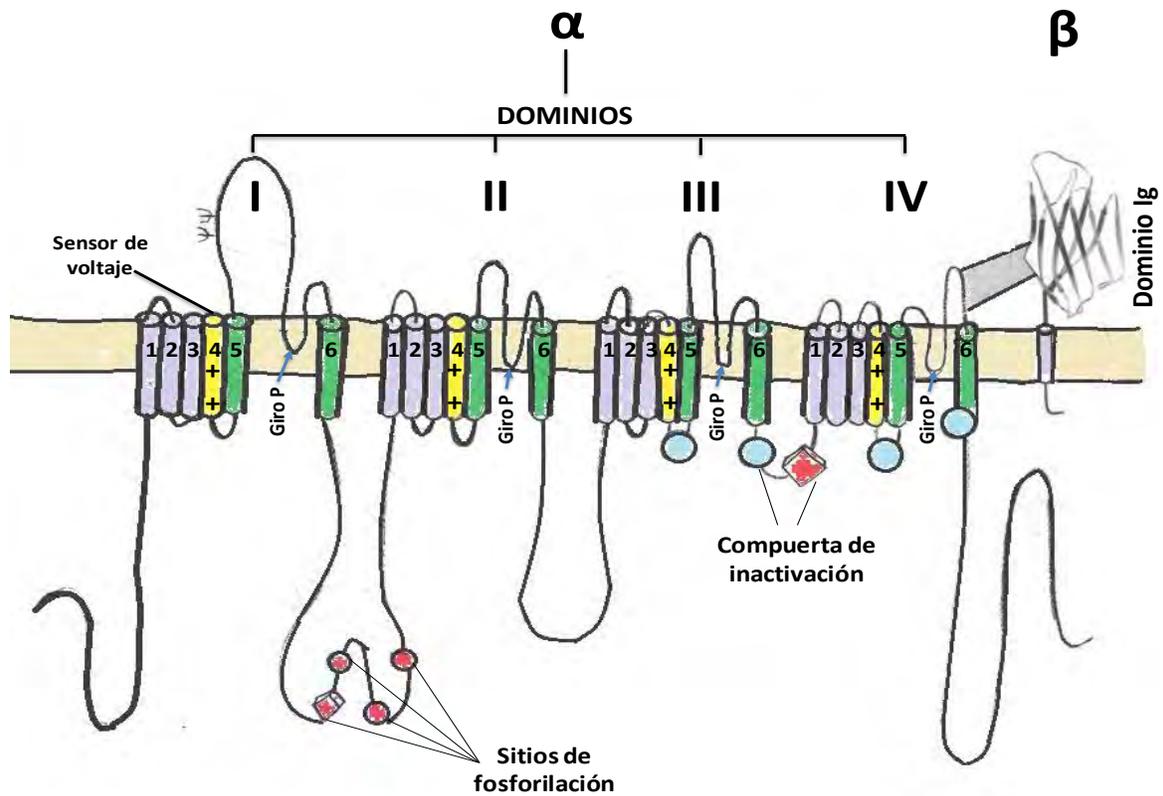


Figura 2. Estructura del canal de sodio sensible a voltaje. Los canales de sodio sensibles a voltaje son proteínas heteroméricas compuestas por una subunidad α y por una o dos subunidades β . La subunidad α está organizada en 4 dominios homólogos (I – IV), cada uno con seis segmentos transmembranales (S1 – S6). Cada dominio tiene un segmento S4 capaz de sensor los cambios de voltaje. Los segmentos S5 y S6 están unidos por cadenas de residuos de aminoácidos, denominadas como giros P, en las cuales se encuentra el filtro de selectividad del canal. El segmento intracelular que conecta a los dominios III y IV funciona como una “compuerta de inactivación”. Las subunidades β están compuestas de un extremo amino terminal con un dominio inmunoglobulina tipo V, un solo segmento α -helicoidal transmembranal y un extremo carboxilo terminal intracelular pequeño.

Por otra parte, las subunidades β con un peso de aproximadamente 30 a 40 kDa, están compuestas de un extremo amino terminal con un dominio inmunoglobulina tipo V, un solo segmento α -helicoidal transmembranal y un extremo carboxilo terminal intracelular pequeño (figura 2) (Catterall, 2012; Namadurai *et al.*, 2015).

Clasificación

Como se muestra en la tabla 1, se han descrito en mamíferos al menos 10 genes que codifican para la subunidad α y los cuales son expresados ya sea en células excitables como neuronas, cardiomiocitos y células β (Catterall, 2012) o no excitables como astrocitos, células cancerígenas y fibroblastos (Black and Waxman, 2013). Sin embargo, cabe destacar que la décima subunidad (Nav_x) no es capaz de sensar los cambios de voltaje, sino solo los cambios en la salinidad (Watanabe *et al.*, 2000).

Tabla 1 Clasificación de la subunidad α de los canales de sodio sensibles a voltaje

Subunidad α	Gen	Sensibilidad a TTX	Células Excitables	Células No excitables
Nav1.1	SCN1A	Sensible	Neuronas del SNC	Queratinocitos
Nav1.2	SCN2A	Sensible	Neuronas del SNC	Astrocitos, osteoblastos
Nav1.3	SCN3A	Sensible	Neuronas del SNC	Astrocitos
Nav1.4	SCN4A	Sensible	Músculo esquelético	Células cancerígenas
Nav1.5	SCN5A	Resistente	Cardiomiocitos	Células cancerígenas, macrófagos
Nav1.6	SCN8A	Sensible	Neuronas del SNC	Astrocitos, macrófagos
Nav1.7	SCN9A	Sensible	Neuronas del SNP, células β	Células cancerígenas, dendríticas
Nav1.8	SCN10A	Resistente	Neuronas GRD,	Queratinocitos
Nav1.9	SCN11A	Resistente	Neuronas GRD	Glía Müller
Nav_x	SCN7A			Útero, astrocitos, hipotálamo

Las subunidades α Nav 1.1 – 1.9 son clasificadas con base en su sensibilidad a concentraciones nanomolares de tetrodotoxina (TTX) (Ahern *et al.*, 2016). Las subunidades α Nav1.1–1.4, Nav1.6 y Nav1.7 son sensibles a TTX y las subunidades α Nav1.5, Nav1.8 y Nav1.9 son resistentes a TTX (aunque pueden ser bloqueadas en concentraciones micromolares) (Kruger and Isom, 2016).

Por otra parte, existen 5 tipos de subunidades β ($\beta 1 - 4$ y $\beta 1B$). A pesar de la alta homología en su secuencia de aminoácidos, cada tipo de subunidad tiene sus particularidades. Por ejemplo, las subunidades $\beta 1$ y $\beta 3$ interactúan con la subunidad α de manera no covalente. Mientras que las subunidades $\beta 2$ y $\beta 4$ están unidas covalentemente a la subunidad α por medio de un enlace disulfuro (Calhoun and Isom, 2014; Namadurai *et al.*, 2015).

Farmacología

La actividad de los canales de sodio sensibles a voltaje es reducida por fármacos usados clínicamente como anestésicos locales (ejemplos benzocaína y lidocaína), antiarrítmicos (ejemplos quinidina y ranolazina) y antiepilépticos (ejemplos difenilhidantoína y carbamazepina)(Catterall and Swanson, 2015; Kwong and Carr, 2015).

Se ha propuesto que la reducción de la conductancia por estos fármacos se logra a través de mecanismos como el bloqueo del poro, exclusión electrostática entre la carga catiónica del fármaco con el sodio en el filtro de selectividad o la estabilización de estados del canal no conductores (Ahern *et al.*, 2016).

Adicionalmente, se ha reportado que los fármacos pueden llegar a su sitio receptor a través de vías hidrofílicas o hidrofóbicas, ya sea en estados abiertos o cerrados del canal. Por lo tanto, esto genera que exista una gran diversidad de fármacos que actúan sobre los canales de sodio (Ahern *et al.*, 2016).

El sitio receptor de estos fármacos está formado por residuos de aminoácidos en la superficie interna de los segmentos S6 en los dominios I, III y IV. El acceso a este sitio requiere la apertura del canal, lo cual proporciona las bases estructurales para un bloqueo dependiente de uso, ya que entre mayor sea la frecuencia de apertura más rápido se unirán los fármacos (Catterall, 2012).

Inhibición de canales de sodio con toxinas

Existen organismos pertenecientes a distintos reinos como el protista, plantae y animalia que han desarrollado y utilizado toxinas como formas de defensa y depredación. Como se muestra en la tabla 2, los canales de sodio son un blanco común para varias toxinas. Esto principalmente por que dichos canales son esenciales para la locomoción a nivel muscular, neuronal y cardíaco (Gilchrist *et al.*, 2014; Kwong and Carr, 2015).

Tabla 2 Toxinas con efectos sobre los canales de sodio sensibles a voltaje

Sitio de unión	Toxinas	Fuente biológica	Efecto sobre la función del canal
Región del poro	Tetrodotoxina, Saxitoxina Batracotoxina	Peces tetradontiformes, Ranas venenosas de dardo	Inhibición del flujo iónico por bloqueo del canal Inhibición de la inactivación Desplazamiento de la activación a potenciales más negativos
	Veratridrina	Plantas de la familia <i>Liliaceae</i>	Apertura persistente del canal
	Brevetoxina, Ciguatoxina	Dinoflagelados	Apertura persistente del canal
	Conotoxina μ Toxina α	Caracoles cono Escorpiones	Inhibición del flujo iónico por bloqueo del canal Inhibición de la inactivación
	Toxina β	Escorpiones	Desplazamiento de la activación a potenciales más negativos
Segmento S4 (sensor de voltaje)	Conotoxina μ O Conotoxina δ Conotoxina ι	Caracoles cono Caracoles cono Caracoles cono	Inhibición de la apertura del canal Inhibición de la inactivación Desplazamiento de la activación a potenciales más negativos
	Pompilidotoxinas Huwentoxina IV Hainantoxina IV	Avispas Arácnidos	Disminución de la inactivación Inhibición de la apertura del canal
	ProTx-II ATXII	Arácnidos Anémonas	Inhibición del flujo iónico por bloqueo del canal Inhibición de la inactivación

Una de las toxinas más ampliamente usadas en la investigación de los canales de sodio es la tetrodotoxina (TTX), la cual es un alcaloide que toma su nombre del orden de peces conocidos por contener a la toxina, es decir los tetradontiformes. Este orden incluye a muchas especies de pez globo (*Takifugu* sp.), los cuales son referidos como la fuente “histórica” de esta toxina (Mattei and Legros, 2014).

La TTX interactúa con una alta afinidad con residuos de tirosina o fenilalanina ubicados en los giros P de cada dominio, por lo que ocluye externamente al poro del canal, evitando el flujo de iones sodio (Diaz-Garcia *et al.*, 2010; Mattei and Legros, 2014).

Regulación endógena

Aunque los cambios en el voltaje del potencial de membrana son el principal mecanismo de regulación de la actividad de los canales de sodio, se ha reportado que estos pueden estar sujetos de regulación por señales endógenas, usualmente efectores río abajo de cascadas de señalización (Velasco *et al.*, 2016). Sin embargo, el efecto generado sobre la actividad de los canales dependerá del tipo de subunidad α presente (Catterall, 2012).

Las fosforilaciones hechas por la proteína cinasa A (PKA) y la proteína cinasa C (PKC) entre los dominios I y II de las subunidades α Nav1.1 y Nav1.2 reducen la actividad de estas. Adicionalmente, la PKC disminuye la inactivación a través de la fosforilación de residuos en la compuerta de inactivación (Cantrell and Catterall, 2001). En contraste, la actividad de la subunidad α Nav1.8 incrementa cuando es fosforilada por PKA y PKC en los mismos sitios que las subunidades α Nav1.1 y Nav1.2 (Vijayaragavan *et al.*, 2004).

En células de la línea RINm5F se ha observado que la aplicación de éster de forbol, el cual es un activador de PKC, disminuye las corrientes de sodio (Rorsman *et al.*, 1987). En células β de rata, la inhibición de proteínas cinasas de tirosina mediante el uso de genisteína y tirfostina A47 conduce a una secreción dañada de insulina (Persaud *et al.*, 1999). Estos resultados sugieren un papel de PKC y cinasas de

tirosina en la inhibición o mantenimiento de una excitabilidad adecuada de la célula β , respectivamente.

Por otra parte, los canales de sodio en las células β pueden ser modulados por efectores río abajo de cascadas de señalización iniciadas por receptores acoplados a proteínas G, puesto que se ha observado que el agonista muscarínico carbacol (100 nM) promueve la liberación de insulina en bajas concentraciones de glucosa (0 – 5.6 mM), efecto que desaparece con la coaplicación de TTX (319 nM) (Hiriart and Ramirez-Medeles, 1993).

Un último ejemplo de regulación endógena para los canales de sodio en las células β está relacionada con los niveles de ATP. Se ha observado que concentraciones de ATP desde 2 a 8 mM desplazan la curva de inactivación a potenciales más positivos y a la par aceleran el tiempo que necesitan los canales de sodio para recuperarse de la inactivación (Zou *et al.*, 2013).

Canales de sodio sensibles a voltaje en las células β

Los canales de sodio sensibles a voltaje no han sido estudiados tan exhaustivamente como otros canales en las células β pancreáticas (Velasco *et al.*, 2016). Sin embargo, estos canales no solo influyen en el proceso de secreción de insulina estimulada por glucosa, ya que recientemente se han reportado nuevos papeles en procesos como la producción de insulina o la apoptosis de la célula β en respuesta a citocinas (Yang *et al.*, 2014; Szabat *et al.*, 2015).

Se ha reportado que las células β pancreáticas de roedores expresan las subunidades α Nav1.7 y Nav1.3 (Vignali *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2014), mientras que las células β de humanos expresan las subunidades Nav1.6 y Nav1.7 (Braun *et al.*, 2008). Con respecto a las subunidades β , las células β expresan predominantemente la β 1 (Ernst *et al.*, 2009).

Inicialmente se pensaba que los canales de sodio no participaban en el proceso de secreción de insulina estimulada por glucosa. Esto debido a que el voltaje en el cual el 50% de los canales estaban inactivados ($V_{i0.5}$) era más negativo que -100 mV en las células β de ratón, siendo el potencial de membrana en reposo cercano a los -80 mV. Adicionalmente, la aplicación de TTX 1.5 μ M no alteraba las respuestas eléctricas cuando la glucosa aumentaba de 3 a 20 mM (Plant, 1988).

En el caso de las células β de rata, la incubación con TTX a una concentración de 200 nM disminuye parcialmente la liberación de insulina estimulada por concentraciones estimulantes de glucosa, lo cual demuestra la participación de estos canales en dicho proceso (Hiriart and Matteson, 1988). Las corrientes de sodio en las células β de rata presentan un máximo de corriente a voltajes de alrededor de +10 mV, con una inactivación completa a los 5 milisegundos de haber iniciado (Hiriart and Matteson, 1988; Rosenbaum *et al.*, 1996).

El 50% de canales activados ($V_{a0.5}$) se alcanza alrededor de +4 mV con una pendiente de activación (k_a) alrededor de 9 mV. Mientras que el 50% de canales inactivados ($V_{i0.5}$) está cercano a los -60 mV con una pendiente de inactivación (k_i) aproximadamente de 10 mV. La inactivación del 100% de los canales se observa en voltajes positivos a -40 mV (Rosenbaum *et al.*, 1996).

Estudios posteriores han confirmado la importancia de estos canales en el proceso de secreción de insulina en células β de perros, cerdos y humanos (Pressel and Misler, 1990; Barnett *et al.*, 1995; Braun *et al.*, 2008). Inclusive en células β de ratón (Ernst *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2014), donde originalmente no se les atribuía ninguna participación.

Complementario al uso de la TTX, otras toxinas han sido consideradas en la exploración de la función de los canales de sodio en las células β . Se ha reportado que la incubación de islotes pancreáticos con veratridina (100 μ M) aumenta la secreción de insulina en concentraciones basales de glucosa (5.6 mM) (Donatsch *et al.*, 1977). Por otra parte, se ha observado que las toxinas α de escorpiones

incrementan la actividad eléctrica y la secreción de insulina estimulada por glucosa en células β de roedores (Gonçalves *et al.*, 2003).

Síndrome metabólico

El síndrome metabólico se define como el grupo de signos que incrementan el riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo 2 (~5 veces mayor riesgo) y enfermedades cardiovasculares (~3 veces mayor riesgo). Entre los principales componentes se encuentran: obesidad central, hipertensión, dislipidemia, hiperinsulinemia, resistencia a la insulina, así como alteración en la tolerancia a la glucosa y en la concentración de glucosa en ayuno (Eckel *et al.*, 2005; Hiriart *et al.*, 2014).

La predisposición genética, un alto consumo de calorías a través de dietas ricas en carbohidratos o grasas y una poca o nula actividad física son algunos de los factores que contribuyen al desarrollo del síndrome metabólico. Durante las tres últimas décadas, se ha observado un aumento a nivel mundial en la prevalencia del síndrome metabólico, convirtiéndolo en un serio problema de salud pública (Hiriart *et al.*, 2014).

Diversas organizaciones como la Organización Mundial de la Salud y el Panel de Tratamiento para el Adulto III del Programa Nacional de Educación en Colesterol, han propuesto sus respectivos criterios para el diagnóstico del síndrome metabólico, lo cual ha causado confusión entre la comunidad médica acerca de cuál criterio es el más adecuado (Miranda *et al.*, 2005; Thaman and Arora, 2013).

En el año 2009 distintas organizaciones como la Federación Internacional de Diabetes, la Asociación Americana del Corazón, la Asociación Internacional para el estudio de la obesidad, entre otras, publicaron una criterio de diagnóstico armonizado del síndrome metabólico (Alberti *et al.*, 2009; Gallagher *et al.*, 2010).

En dicho criterio se postuló que para el diagnóstico del síndrome metabólico se deben observar por lo menos tres de las siguientes condiciones:

- Obesidad abdominal: se determina midiendo la circunferencia de la cintura y tomando como referencia la población o etnia.
- Hipertrigliceridemia: ≥ 150 mg/dL
- Concentraciones bajas de colesterol HDL: <40 mg/dL en hombres y <50 mg/dL en mujeres
- Elevación de presión arterial $\geq 130/85$ mm Hg
- Alteración de glucosa en ayuno: ≥ 100 mg/dL

Fisiopatología del síndrome metabólico

A pesar de los avances en la investigación de la fisiopatología del síndrome metabólico durante las últimas décadas, aún hay muchos aspectos que permanecen poco claros. Sin embargo, es ampliamente aceptado que la obesidad abdominal y la resistencia a la insulina actúan en conjunto como los principales mecanismos en el desarrollo del síndrome metabólico (Bruce and Byrne, 2009).

La obesidad abdominal se genera principalmente por la acumulación excesiva de tejido adiposo visceral. El tejido adiposo secreta una gran cantidad de sustancias bioactivas conocidas como adipocinas, tales como leptina, resistina, interleucina 6 (IL-6), angiotensina II y factor de necrosis tumoral α (TNF- α) (Gallagher *et al.*, 2010).

Se ha propuesto que dichas adipocinas generan una condición inflamatoria crónica, la cual puede interferir en la cascada de señalización PI3K a través de la fosforilación de residuos de serina en la proteína sustrato del receptor de insulina (IRS). De esta manera, las adipocinas contribuyen en el desarrollo de la resistencia a la insulina (Gallagher *et al.*, 2010).

La adiponectina también es secretada por el tejido adiposo y se caracteriza por tener una acción biológica anti inflamatoria, anti aterogénica y por estar ligada con una

óptima sensibilidad a la insulina. Sin embargo, cuando se desarrolla obesidad abdominal la secreción de esta adipocina se encuentra disminuida (Hiriart *et al.*, 2014).

Por otra parte, la resistencia a la insulina se define como la existencia de defectos en la respuesta de los tejidos periféricos; principalmente, hígado, músculo y tejido adiposo, a esta hormona. Esto se debe a que la señalización de la insulina se encuentra alterada en sus tejidos diana. Lo anterior se relaciona con un aumento en los niveles sanguíneos de insulina (hiperinsulinemia) y glucosa en condiciones de ayuno y posprandiales (Hiriart *et al.*, 2014).

Cuando la resistencia a la insulina se desarrolla en el tejido adiposo se presenta un aumento en la lipólisis de los triglicéridos almacenados, generando un aumento en la concentración sanguínea de ácidos grasos libres. Estos últimos junto con la presencia de acil-CoA, diacilglicerol y adipocinas pro inflamatorias generan resistencia a la insulina en hígado y músculo esquelético (Miranda *et al.*, 2005). También provocan disfunción en células endoteliales y células β (Donath and Shoelson, 2011; Rask-Madsen and Kahn, 2012).

Mientras que en el hígado algunos de los efectos que se observan cuando hay resistencia a la insulina son alteraciones en la síntesis de glucógeno, fallas en la supresión de la gluconeogénesis, sobreproducción de triglicéridos unidos a lipoproteínas de muy baja densidad y disminución en la producción de colesterol HDL (Bruce and Byrne, 2009). Mientras que una menor captación de glucosa es observada en músculo debido a una reducción en la translocación del transportador de glucosa GLUT4 (Rask-Madsen and Kahn, 2012).

Alteraciones en las células β

El aumento en la concentración sanguínea de glucosa causado por el desarrollo de resistencia a la insulina sobreestimula crónicamente a las células β , por lo que estas secretan más insulina. Esto genera que la concentración plasmática de dicha

hormona aumente, condición conocida como hiperinsulinemia. Con el tiempo la secreción de insulina disminuye, proceso conocido como agotamiento de las células β , y se desarrolla la hiperglucemia característica de la diabetes mellitus tipo 2 (Velasco *et al.*, 2012).

Las respuestas adaptativas que se observan en las células β ante los efectos generados por la resistencia a la insulina han sido organizadas básicamente en las siguientes fases: compensación, descompensación y fallo severo de las células β (Weir and Bonner-Weir, 2004; Poitout *et al.*, 2010).

La fase de compensación se presenta en condiciones de resistencia a la insulina asociada con obesidad, pero sin alteraciones en la normoglucemia. Diversos autores han observado que durante esta fase hay aumentos en la masa de células β y una mayor biosíntesis y secreción de insulina (Nolan *et al.*, 2006; Fex *et al.*, 2007; Gonzalez *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2016).

Durante la fase de descompensación se ha observado una disminución en la primera fase de la secreción de insulina asociada con una expresión disminuida del gen de la insulina (Nolan *et al.*, 2006; Fex *et al.*, 2007). Adicionalmente, comienza a observarse una disminución en la masa de células β y una pérdida del fenotipo de estas células. Por lo que durante esta etapa es perceptible un aumento en la concentración sanguínea de glucosa (Weir and Bonner-Weir, 2004).

Finalmente, se desarrolla una glucolipototoxicidad que repercute en un fallo severo por parte de las células β (Poitout *et al.*, 2010). Este es observado como una disminución drástica de la secreción de insulina asociada con una disminución de alrededor del 50% en la masa de las células β y con una severa desdiferenciación de dichas células (Jonas *et al.*, 1999; Butler *et al.*, 2003). Por lo tanto, esta fase se considera como diabetes mellitus tipo 2 franca (Weir and Bonner-Weir, 2004).

Modelos animales para el estudio del síndrome metabólico

Con el objetivo de elucidar los cambios histológicos, funcionales, bioquímicos y moleculares que conllevan al desarrollo del síndrome metabólico se han utilizado diversos modelos animales, de entre los cuales la rata y el ratón son los más comunes. Algunos de los enfoques más populares que existen para inducir síndrome metabólico en estos roedores incluyen la manipulación de la dieta, así como la modificación genética (Larqué *et al.*, 2011; Aydin *et al.*, 2014).

Los enfoques genéticos suelen requerir un tiempo más corto en la inducción del síndrome metabólico. Numerosos modelos animales han sido desarrollados, tales como ratones deficientes en leptina (*ob/ob*) o en el receptor de leptina (*db/db*), ratas Goto-Kakizaki (GK), ratas Zucker (ZF) y Zucker diabéticas (ZDF), siendo estas dos últimas las que desarrollan más componentes del síndrome como resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, dislipidemia e hipertensión (Wong *et al.*, 2016).

Por otra parte, los enfoques dietéticos abarcan desde el uso de un solo tipo de dieta, ya sea alta en fructosa, alta en sacarosa o alta en grasa hasta la combinación de estas (Wong *et al.*, 2016). Adicionalmente, los efectos producidos dependen de la cantidad (~60 – 80% de la ingesta calórica diaria) y, de ser el caso, del tipo de grasa a usar (manteca de cerdo o aceites de soya, oliva o coco, entre otros) (Larqué *et al.*, 2011).

Los roedores más usados en los enfoques dietéticos incluyen a los ratones C57BL/6J, hamsters dorados, ratas Sprague-Dawley y ratas Wistar. En particular, los ratones de esta cepa desarrollan síndrome metabólico con mayor eficiencia mediante el uso de dietas altas en grasas (Larqué *et al.*, 2011). Los cambios observados con estas dietas incluyen: aumento en peso corporal y tejido adiposo, niveles elevados de ácidos grasos, colesterol y triglicéridos, hiperinsulinemia e hiperglucemia (Panchal and Brown, 2011; Aydin *et al.*, 2014).

Por otra parte, las ratas son más susceptibles al desarrollo de síndrome metabólico mediante el uso de dietas altas en carbohidratos (Larqué *et al.*, 2011). Uno de los

modelos más comunes es la administración de sacarosa en el agua de bebida. Los cambios reportados con este modelo incluyen aumento en el peso corporal, en tejido adiposo, presión arterial, así como en los niveles de triglicéridos y colesterol. Cambios en la concentración y tolerancia a la glucosa también son observados (Larqué *et al.*, 2011; Velasco *et al.*, 2012; Wong *et al.*, 2016).

Después de llevarse a cabo el consumo de sacarosa, esta se hidroliza en glucosa y fructosa por la enzima sacarasa. La fructosa, al ser mejor sustrato que la glucosa en la síntesis de ácidos grasos en el hígado, provoca una mayor acumulación de triglicéridos y colesterol, conduciendo subsecuentemente al desarrollo de resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa. Por lo tanto, es el principal ingrediente activo que contribuye al desarrollo del síndrome metabólico mediante el consumo de sacarosa (Panchal and Brown, 2011; Wong *et al.*, 2016).

ANTECEDENTES AL PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

Como efecto de la resistencia a la insulina desarrollada durante el síndrome metabólico, las células β pancreáticas secretan una mayor cantidad de insulina, aumentando la concentración sanguínea de dicha hormona (hiperinsulinemia). Sin embargo, los mecanismos celulares que conllevan a esta hiperinsulinemia en las células β no han sido completamente explorados.

Previamente nuestro grupo de investigación desarrolló un modelo de síndrome metabólico inducido por dieta. Este consistió en la administración de una solución con sacarosa 20% en el agua de bebida a ratas macho con un peso de 250 -280g de la cepa Wistar, las cuales no poseen susceptibilidad genética a desarrollar obesidad y diabetes. El periodo de administración consistió en 8 semanas (Larqué *et al.*, 2011) o 24 semanas (Velasco *et al.*, 2012).

Después de las 8 semanas de administración con sacarosa 20% en el agua de bebida, los cambios que se observaron consistieron en: aumentos en el peso corporal, circunferencia abdominal, peso del tejido adiposo visceral, niveles de insulina plasmática, triglicéridos y presión sanguínea. Adicionalmente se desarrolló intolerancia a la glucosa.

De manera interesante, se observó un aumento en la cantidad total del transportador de glucosa GLUT2 en las membranas plasmáticas de células β . Esto sugiere que podría existir una mayor utilización de la glucosa en las células β , explicando parcialmente la hipersecreción de insulina (Larqué *et al.*, 2011).

Por otra parte, después de la administración de sacarosa 20% durante 24 semanas, se observó un empeoramiento de los cambios reportados con la administración durante 8 semanas, con la adición del desarrollo de hiperglucemia y resistencia a la insulina. Bajo este diseño experimental se observaron efectos del síndrome metabólico sobre la actividad de los canales K_{ATP} y las corrientes de calcio en las células β pancreáticas (Velasco *et al.*, 2012).

Los canales K_{ATP} de células β provenientes de ratas con síndrome metabólico presentaron un aumento en la sensibilidad hacia el ATP ($K_d = 10.1 \pm 0.9 \mu M$). Esto significa que dichos canales se cierran en concentraciones de ATP menores comparados con los canales K_{ATP} de ratas sin síndrome metabólico ($K_d = 18.3 \pm 0.01 \mu M$).

Aunado a estos efectos, se observó que la densidad de corriente de calcio podía ser usada para clasificar a las células β en células β con una densidad de corriente baja (representando un 50% del total de células estudiadas), en células β con una densidad de corriente alta (equivalente al 35% del total de células estudiadas) y células β que no presentaban corriente (15% del total de células estudiadas).

Esto sugiere que una densidad de corriente de calcio alta en las células β , aunado a una mayor sensibilidad hacia el ATP por parte de los K_{ATP} , son parte del mecanismo que explica el aumento en la secreción de insulina durante el síndrome metabólico. Por otra parte, las células β sin corriente de Ca^{2+} pueden ser células exhaustas e incapaces de secretar más insulina, las cuales pueden dar paso al desarrollo de diabetes mellitus.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los efectos generados por el síndrome metabólico sobre la sensibilidad hacia el ATP por parte de los K_{ATP} y las densidades de corriente de calcio en las células β pancreáticas abren un panorama de posibles efectos sobre otros canales iónicos que participan en la secreción de insulina estimulada por glucosa.

A pesar de que los canales de sodio sensibles a voltaje han sido reportados como un factor importante en el proceso de secreción de insulina, no se ha analizado su actividad en situaciones fisiopatológicas como lo es el síndrome metabólico. Adicionalmente, un mayor conocimiento de los cambios generados durante el desarrollo temprano de este síndrome ayudará a generar estrategias que puedan revertirlo a tiempo.

Por lo tanto, en este trabajo nos interesó analizar los efectos del síndrome metabólico (durante su desarrollo temprano) sobre la actividad de los canales de sodio sensibles a voltaje en las células β pancreáticas y su repercusión en el proceso de secreción de insulina estimulada por glucosa.

HIPÓTESIS

El síndrome metabólico aumentará la densidad de corriente a través de los canales de sodio sensibles al voltaje en las células β , contribuyendo a que estas tengan una mayor secreción de insulina.

OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto del síndrome metabólico sobre los canales de sodio sensibles al voltaje en las células β , con particular énfasis en las propiedades electrofisiológicas, y la contribución de estos en el proceso de secreción de insulina.

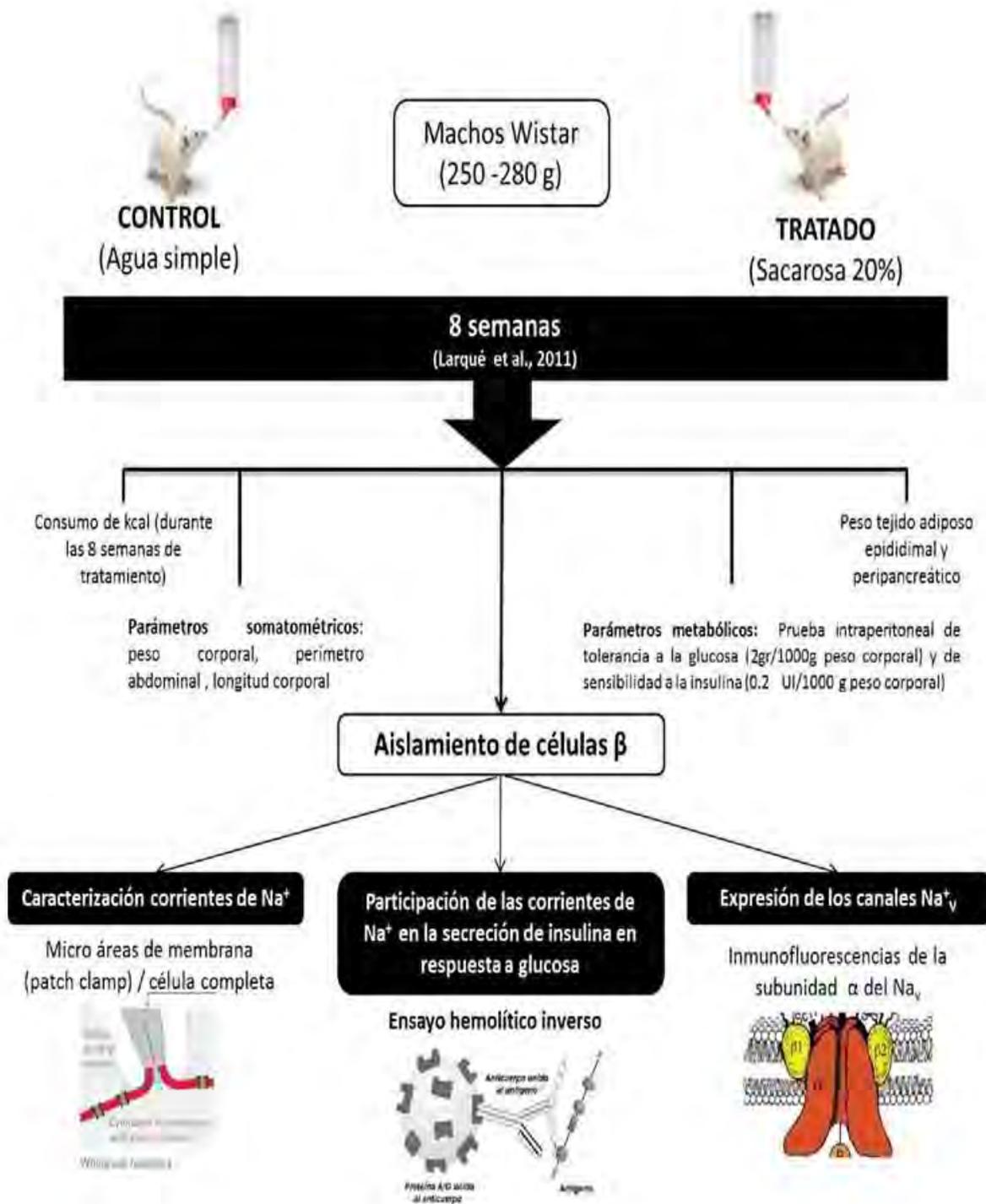
OBJETIVOS PARTICULARES

Se utilizarán células β de animales con y sin síndrome metabólico para cumplir con los siguientes objetivos:

1. Caracterizar las corrientes de sodio sensibles a voltaje analizando:
 - Relación de corriente – voltaje, en presencia y ausencia del bloqueador tetrodotoxina
 - Dependencia de voltaje de la activación
 - Inactivación de estado estacionario
2. Analizar la participación de las corrientes de sodio sensibles a voltaje en la secreción de insulina en respuesta a glucosa.
3. Cuantificar la presencia de los canales de sodio sensibles al voltaje en las células β .

METODOLOGÍA

Diseño experimental



Modelo animal

Se utilizaron ratas macho adultas jóvenes de 250 – 280 g de peso corporal (aproximadamente 2 meses de edad) de la cepa Wistar, obtenidas del bioterio del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Los animales se mantuvieron en ciclos de 12 horas luz/ 12 horas oscuridad y alimentados con alimento estándar para rata (Laboratory rodent 5001) con una composición de 28.5% proteína, 13.5% grasa y 58% carbohidrato. El cuidado animal se realizó de acuerdo a la Guía Internacional de Principios para la Investigación Biomédica con Animales.

Se trabajó con dos grupos experimentales, de los cuales el grupo tratado tuvo acceso *ad libitum* a agua con sacarosa al 20%, mientras que el grupo control lo tuvo a agua simple. La duración del tratamiento fue de 8 semanas, como previamente reportado (Larqué *et al.*, 2011). Durante el periodo de administración con glucosa, se cuantificó el consumo de agua y dieta sólida.

Al finalizar las 8 semanas de tratamiento, los animales fueron ayunados por 12 horas y anestesiados con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (40 mg/kg). Se midió la circunferencia abdominal (región abdominal justo por encima de la cresta iliaca) y la longitud corporal (desde la punta de la nariz hasta el ano) mediante el uso de una cinta métrica.

Posteriormente, muestras sanguíneas fueron colectadas de la vena cava inferior en tubos heparinizados y centrifugadas a 2000 r.p.m durante 10 minutos en una temperatura de 4° C. Los plasmas sanguíneos se recolectaron, congelados y almacenados a una temperatura de -20° C hasta su posterior uso en la cuantificación de niveles de insulina y triglicéridos.

Adicionalmente, se extrajeron los depósitos de tejido adiposo epididimal y peripancreático, los cuales se pesaron en una balanza analítica. También se llevó a cabo la extracción del páncreas para el subsecuente aislamiento de células β . Después de la obtención de dichas muestras biológicas, los animales fueron eutanizados por dislocación cervical.

Cuantificación de niveles plasmáticos de insulina y triglicéridos

Los niveles de insulina plasmática se cuantificaron por medio de un sistema de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA para insulina de rata, Mercodia Ultrasensitive), siguiendo las instrucciones del fabricante. Por otra parte, la cuantificación de triglicéridos plasmáticos se llevó a cabo por medio de una prueba colorimétrica enzimática (GPO-PAP, Randox Laboratories) en el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

Pruebas intraperitoneales de tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina

Días previos a la finalización de las 8 semanas de tratamiento, se realizaron pruebas de tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina, a animales de ambos grupos experimentales con un ayuno de 12 horas, mediante la administración intraperitoneal de una solución con glucosa (2 g glucosa/kg de peso corporal, Sigma-Aldrich) o una solución con insulina (0.2 UI/kg de peso corporal, Humulin R U-100).

Previo a la administración de las soluciones, se cuantificó la concentración de glucosa sanguínea obtenida de la cola de los animales mediante el uso de un glucómetro (Medisense, Optium Xceed, Abbott Labs), así como a los 15, 30, 60, 90 y 120 minutos posteriores a dicha administración.

Aislamiento y cultivo de células β pancreáticas

Previo al aislamiento de los islotes pancreáticos, el páncreas fue insuflado con una solución salina balanceada de Hank (Sigma Aldrich). Posteriormente, el páncreas insuflado se estrajo. Los islotes pancreáticos se aislaron y separaron del tejido acinar mediante la digestión por colagenasa tipo IV (0.3 mg/ml, Sigma Aldrich) en solución salina balanceada de Hank (Sigma Aldrich), como ha sido descrito previamente (Navarro-Tableros *et al.*, 2006; Velasco *et al.*, 2012).

Después de recuperar los islotes pancreáticos manualmente, se llevó a cabo su disociación celular mediante la incubación en solución Spinner libre de calcio con glucosa 10 mM, albúmina sérica bovina 0.5%, EGTA 3 mM y tripsina 0.05% durante 3 minutos en baño con agitación a 37°C, seguida de disgregación mecánica.

Finalmente, las células fueron cultivadas en RPMI-1640 (Life Technologies) suplementado con suero bovino fetal 10%, glutamina 1%, penicilina G 200 unidades/ml, estreptomycin 200 µg/ml y anfotericina B 0.5 µg/ml durante toda la noche para su posterior uso.

Electrofisiología de las células β

Las corrientes iónicas en células β fueron registradas en microáreas de membrana, en la modalidad de célula entera (whole-cell patch –clamp) a una temperatura de 21°C (Hamill *et al.*, 1981). Los registros fueron realizados con un amplificador Axopatch 200A (Axon Instruments) conectado a un convertidor Digidata 1322A A/D (Axon Instruments).

A partir de tubos capilares Kimax-51 (Kimble Glass), se fabricaron pipetas con una resistencia entre 2 – 4 m Ω , las cuales fueron cubiertas con Sylgard (Dow Corning). La generación de pulsos y la adquisición de datos se realizaron con el software pClamp versión 8.0 (Axon Instruments). Las señales se filtraron a 2 kHz previamente a la digitalización de los registros. Se seleccionaron como células β únicamente a aquellas células cuyas capacitancias estuvieran dentro del rango de 5 – 10 pF (Velasco *et al.*, 2012).

La corriente de sodio se obtuvo con un protocolo de pulsos despolarizantes de 10 mV, con una duración de 15 milisegundos, y a partir de un potencial de mantenimiento de -80 mV. Para estudiar la inactivación de estado estacionario de las corrientes de sodio, se utilizó un protocolo de doble pulso, el cual consistió en un prepulso de 50 milisegundos que iba de los -150 mV hasta los +20 mV seguido de un pulso de prueba de 15 milisegundos en un potencial de +20 mV.

Los datos de la inactivación de estado estacionario fueron ajustados con la ecuación de Boltzmann:

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

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

Para el caso de la dependencia de voltaje de la activación, la conductancia se obtuvo usando la siguiente ecuación:

$$G_{Na} = I_{Na} / (V_m - E_{Na})$$

Donde I_{Na} es la corriente de sodio al pico (peak sodium current), V_m el potencial del pulso en que se obtuvo I_{Na} y E_{Na} el potencial de inversión observado en la relación corriente – voltaje obtenido con NaCl 10 mM en la solución de registro interna y el cual equivale a +75 mV en promedio.

Posteriormente los datos de conductancia obtenidos fueron normalizados y ajustados con la ecuación de Boltzmann:

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

Donde G / G_{max} es la relación entre la conductancia (G) y la conductancia máxima en el V_{pre} más negativo (G_{max}), A es el mayor nivel de G / G_{max} , $V_{1/2}$ es el potencial en el cual G / G_{max} es la mitad de su máximo, y k representa el factor de la pendiente.

Por otra parte, para analizar la corriente de calcio se utilizó un protocolo de rampa. El protocolo inició con un potencial de mantenimiento a -80 mV durante 10 milisegundos, para después subir a +80 mV en un tiempo de 480 milisegundos (razón de cambio de 0.33 mV/ms).

Soluciones de registro

Para obtener los registros de las corrientes de sodio en las células β , se utilizaron las siguientes soluciones:

- Solución externa (pH 7.35): NaCl 130 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 2.5 mM, MgCl₂ 1 mM, Hepes 10 mM y glucosa 10 mM.
- Solución interna (pH 7.2): CsAsp 110 mM, CsCl 10 mM, CsF 5 mM, NaCl 10 mM, Hepes 10 mM y BAPTA 2.5 mM.

Para obtener los registros de las corrientes de calcio en las células β , se utilizaron las siguientes soluciones:

- Solución externa (pH 7.35): NaCl 125 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 2 mM, Hepes 10 mM, BaCl₂ 10 mM, glucosa 10 mM y TTX 100 nM.
- Solución interna (pH 7.2): CsAsp 110 mM, CsCl 10 mM, CsF 5 mM, Hepes 10 mM, BAPTA 2.5 mM y ATP 2 mM.

Ensayo hemolítico inverso

Para analizar el efecto del síndrome metabólico sobre la participación de las corrientes de sodio sensibles a voltaje en la secreción de insulina se utilizó el ensayo hemolítico inverso, con un método similar al descrito por Hiriart y Matteson (1988). Después de un día de cultivo, las células pancreáticas fueron resuspendidas, se mezclaron con eritrocitos de borrego cubiertos con proteína A de *Staphylococcus aureus*, y se introdujeron en cámaras de Cunningham previamente tratadas con poli-L-lisina.

Las células fueron sembradas en una monocapa de eritrocitos y fueron incubadas con solución salina balanceada de Hank más glucosa en una concentración basal (5.6 mM) o estimulante de secreción de insulina (15.6 mM), en presencia o ausencia de TTX (200 nM) o nifedipina (5 μ M), durante una hora a 37°C. Simultáneamente, se incubaron con un anticuerpo anti-insulina para, posteriormente, ser incubadas con sistema de complemento de cobayo.

Como resultado de la lisis mediada por el sistema de complemento de los eritrocitos que tuvieron complejos insulina/anticuerpo en sus membranas, la liberación de insulina se detectó mediante la formación de inmunoplasmas alrededor de las células β . Cada cámara de Cunningham, con sus respectivas condiciones de glucosa y toxinas, fue escaneada con un microscopio Leica Micro Dissection System 6000 (versión 6.4.1.2887) acoplado a una cámara Hitachi HV-D20.

Se cuantificó el área de las inmunoplasmas formadas y el área de las células, así como la fracción de células secretoras, donde al menos se cuantificaron 200 células por replica. Para cada condición se realizaron al menos tres experimentos independientes por duplicado. La multiplicación del promedio de las áreas de inmunoplasma y la fracción de células secretoras dan como resultado el índice de secreción, el cual describe el efecto de las fracciones activas sobre la función secretora.

Finalmente, con base en lo reportado por Hiriart y Ramirez-Medeles (1991) se consideraron dos grupos principales de células secretoras: las que forman placas pequeñas (SP según sus siglas en inglés *small plaque-forming cells*, con áreas de inmunoplasmas $\leq 2000 \mu\text{m}^2$) y las de placas grandes (LP de *large plaque-forming cells*, con áreas de inmunoplasmas $>2000 \mu\text{m}^2$). Este tipo de subpoblaciones de células β fueron analizadas mediante la elaboración de histogramas de frecuencia en las distintas condiciones experimentales.

Inmunofluorescencia de la subunidad $\alpha 1.7$ del canal de sodio

Para poder analizar los efectos del síndrome metabólico sobre la expresión de los canales de Na^+ sensibles a voltaje en la membrana de las células β , se realizaron inmunofluorescencias dirigidas contra la subunidad $\alpha 1.7$ del canal de sodio sensible a voltaje.

Después de un día de cultivo, las células pancreáticas (adheridas a cubreobjetos previamente tratados con poli-L-lisina) fueron fijadas con paraformaldehído 2% por

30 minutos y almacenadas con buffer salino de fosfato (PBS) a 4°C hasta su uso. Las células β fueron permeabilizadas y bloqueadas con una solución de triton-X100 (0.1%) y suero normal de cabra (2%) en PBS por 45 minutos.

Posteriormente, las células fueron incubadas con un anticuerpo anti-insulina (1:2500) a temperatura ambiente por 2 horas, tras lo cual fueron incubadas con un anticuerpo secundario anti-cobayo conjugado con FITC a temperatura ambiente por una hora (1:100, Jackson ImmunoResearch Laboratories).

Inmediatamente después, las células se incubaron con un anticuerpo anti-Nav1.7 (1:100, Alomone labs) a 4°C durante una noche. Al día siguiente, las células fueron incubadas con un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con Alexa 647 a temperatura ambiente por una hora (Jackson ImmunoResearch Laboratories).

Finalmente, las células fueron incubadas con 4', 6-diamino 2-indol (DAPI) por 5 minutos a temperatura ambiente, y además se utilizó medio de montaje para preservar fluorescencia (DAKO Inc). Las inmunofluorescencias fueron observadas y capturadas con un microscopio Leica SFL 100 (Leica Microsystems) en el Laboratorio Nacional de Canalopatías del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Análisis estadístico

Todos los datos se reportan como medias \pm error estándar de la media, a menos que sea indicado de otra forma. Las pruebas estadísticas se realizaron con el paquete estadístico GraphPad Prism v.6.01 (Graphpad Software, Inc.). Valores de $p < 0.05$ se consideraron significativos para las pruebas t realizadas.

RESULTADOS

Caracterización del modelo

Ingesta calórica

Durante las 8 semanas de administración de sacarosa 20% se cuantificó el consumo de agua y dieta sólida entre los animales de ambos grupos experimentales. Como se muestra en la tabla 3, los animales del grupo tratado tuvieron un menor consumo de dieta sólida. Sin embargo, el consumo de agua en los animales tratados, la cual en su caso contenía sacarosa 20%, fue mayor que en los animales controles. Esto genera una mayor ingesta calórica diaria, de la cual alrededor del 80% proviene de carbohidratos.

Tabla 3 Cuantificación de la ingesta calórica durante las 8 semanas de administración con sacarosa 20%

	Control (n = 8)	Tratado (n = 8)
Consumo alimento sólido (g/día/rata)	27.96 ± 0.35	12.21 ± 0.4 ***
Consumo agua (ml/día/rata)	63.81 ± 1.88	74.01 ± 1.26 ***
Ingesta calórica (kcal/día/rata)	93.68 ± 1.19	101.6 ± 1.14 ***
Aporte calórico de carbohidratos (%)	53.16 ± 0.67	83.91 ± 0.87 ***

Los valores representan media ± E. E. M. *** Diferencia estadística p < 0.001.

Parámetros somatométricos

Como se muestra en la tabla 4, después de la administración de sacarosa 20% durante 8 semanas los animales del grupo tratado tuvieron un mayor peso corporal que los animales del grupo control. Este aumento en el peso se asoció con un incremento en el perímetro abdominal y una mayor acumulación de tejido adiposo epididimal y peripancreático sin cambios en la longitud de los animales.

Tabla 4 Parámetros somatométricos de los animales de ambos grupos experimentales

	Control (n = 29)	Tratado (n = 28)	
Peso corporal (g)	417.2 ± 7.32	462.1 ± 11.76	***
Perímetro abdominal (cm)	19.55 ± 0.20	20.73 ± 0.26	***
T. adiposo epididimal (g)	2.95 ± 0.17	5.90 ± 0.43	***
T. adiposo peripancreático (g)	0.81 ± 0.04	2.10 ± 0.15	***
Longitud (cm)	23.98 ± 0.14	24.27 ± 0.15	

Los valores representan media ± E. E. *** Diferencia estadística p < 0.001.

Parámetros metabólicos

Al finalizar el periodo de administración de sacarosa 20%, los animales del grupo tratado presentan una mayor concentración de plasmática de insulina (figura 3A) y de triglicéridos (figura 3B) comparados con los animales del grupo control. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de glucosa en ayuno (figura 3C).

En la figura 3D se muestra la prueba intraperitoneal de tolerancia a la glucosa realizada en animales de ambos grupos al finalizar las 8 semanas de tratamiento con sacarosa 20%. Previo a la administración intraperitoneal de una solución de glucosa (2 g/ kg peso corporal, tiempo 0) los niveles de glucosa sanguínea son semejantes entre ambos grupos. Sin embargo, 15 minutos posteriores a dicha administración se alcanza un valor máximo en la concentración de glucosa para ambos grupos.

De manera interesante, el pico alcanzado en el grupo tratado es superior al del grupo control y esto se mantienen a los 30, 60 y 90 minutos posteriores a la administración intraperitoneal de glucosa. Después de 120 minutos, no se observan diferencias entre ambos grupos. Por lo tanto, el área bajo la curva generado con los valores de glucosa sanguínea durante la prueba es estadísticamente mayor en los animales del grupo tratado que en los del grupo control, lo cual se interpreta como una menor tolerancia hacia la glucosa.

En la figura 3E se muestra la prueba intraperitoneal de sensibilidad a la insulina realizada en animales de ambos grupos. La disminución en la concentración de

glucosa inicial entre ambos grupos no fue significativamente diferente en ninguno de los tiempos considerados, lo cual se corrobora con la ausencia de diferencias en el área bajo la curva. Esto significa que la sensibilidad a la insulina en los animales del grupo tratado no se altera después de 8 semanas de administración con sacarosa 20%.

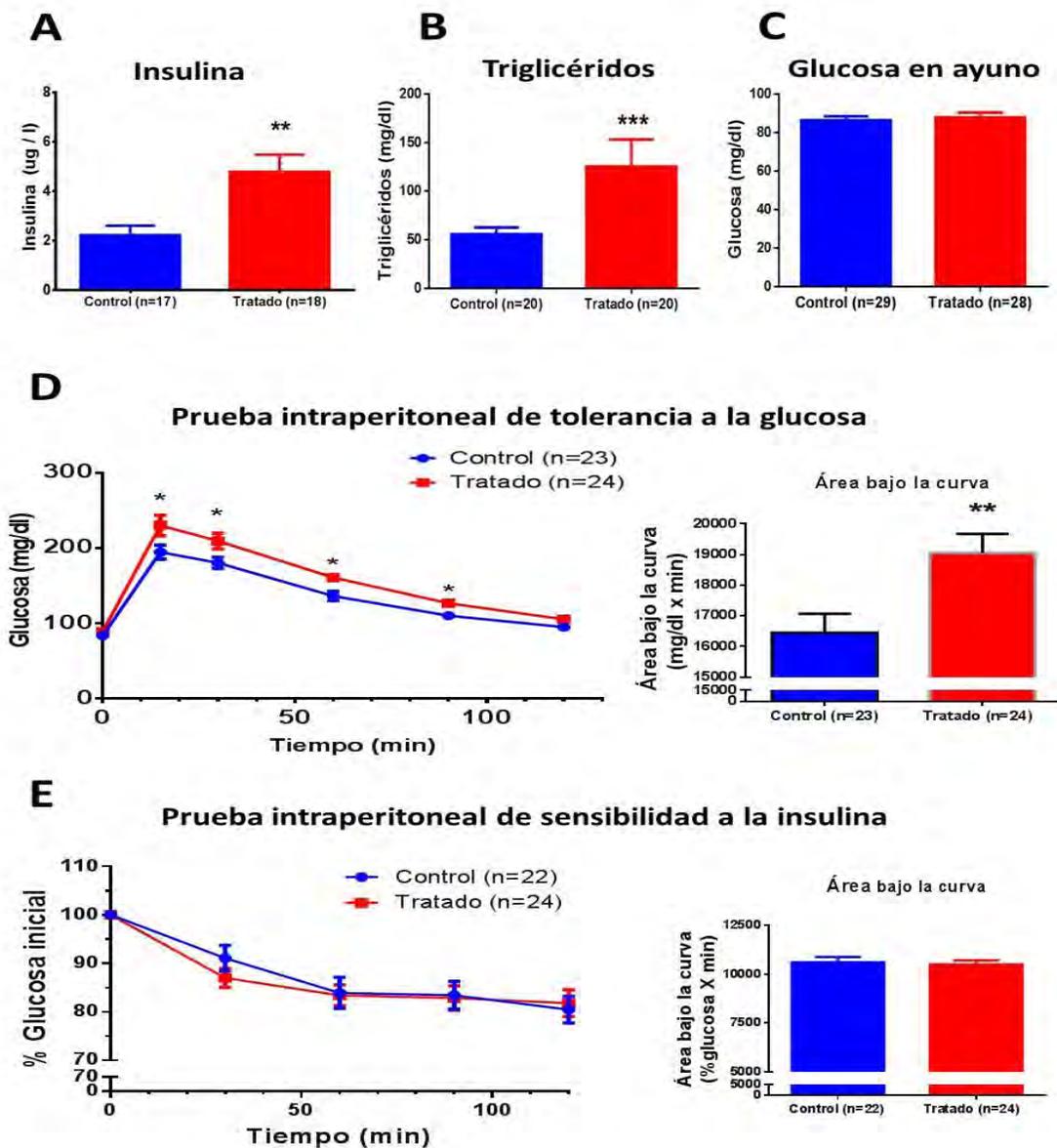


Figura 3. Parámetros metabólicos medidos después de 8 semanas de administración con sacarosa 20%. A) Concentración plasmática de insulina. B) Concentración plasmática de triglicéridos. C) Concentración sanguínea de glucosa en ayuno. D) Pruebas intraperitoneal de tolerancia a la glucosa y área bajo la curva. E) Prueba intraperitoneal de sensibilidad a la insulina y área bajo la curva. En todas las gráficas los valores representan media \pm E. E. * Diferencia estadística $p < 0.05$. ** Diferencia estadística $p < 0.01$. *** Diferencia estadística $p < 0.001$.

Caracterización de las corrientes de sodio sensibles a voltaje

Densidad de corriente de Na⁺

En la figura 4A se muestran las familias de corrientes de sodio representativas para las células β de animales controles y tratados, las cuales fueron obtenidas mediante un protocolo de pulsos despolarizantes. La corriente de sodio en ambas células se activa rápidamente, alcanzando una amplitud máxima alrededor de 600 pA y una inactivación después de 5 ms de haberse activado.

En la figura 4B se muestra el efecto sobre las corrientes de sodio causado por la presencia del bloqueador específico de canales de sodio tetrodotoxina (TTX) en una concentración de 200 nM. En presencia de dicho bloqueador, las corrientes de sodio en células β de ambos grupos se bloquean totalmente, dejando únicamente como remanente una aparente corriente de calcio.

Por otra parte, la capacitancia de las células utilizadas para el registro de las corrientes de sodio no fue estadísticamente diferente (control = 7.4 ± 0.22 pF vs tratado = 6.9 ± 0.16 pF). Cuando la corriente de sodio se expresa en función de la capacitancia (densidad de corriente), no se observan diferencias entre ambos grupos.

En la figura 4C se muestra la densidad de corriente de sodio en función del voltaje (relación I-V) en células β de ambos grupos experimentales. Las corrientes de sodio se comportan de manera similar en ambos grupos: se activan en un potencial alrededor de -30 mV y presentan una corriente máxima alrededor de +10 mV.

En presencia de TTX, se observa un bloqueo similar de la corriente de sodio entre las células β de ambos grupos. La corriente remanente tiene una activación notoria alrededor de -20 mV y una corriente máxima entre 0 – +10 mV, lo cual sugiere una posible corriente de calcio.

Dependencia de voltaje de la activación

La relación de corriente – voltaje para las corrientes de sodio en cada célula β fue analizada y ajustada mediante la ecuación de Boltzmann, con lo cual se obtuvo la dependencia de voltaje de la activación (figura 5). El potencial de membrana en el cual se alcanza la mitad de la conductancia de sodio ($V_{a0.5}$) no fue significativamente diferente entre las células β de ambos grupos (control $V_{a0.5} = -2.54 \pm 1.16$ mV vs tratado $V_{a0.5} = -3.09 \pm 0.75$ mV). Tampoco se observaron diferencias en la pendiente de la activación (k_a) entre ambos grupos (control $k_a = 8.07 \pm 0.25$ mV vs tratado $k_a = 7.71 \pm 0.44$ mV).

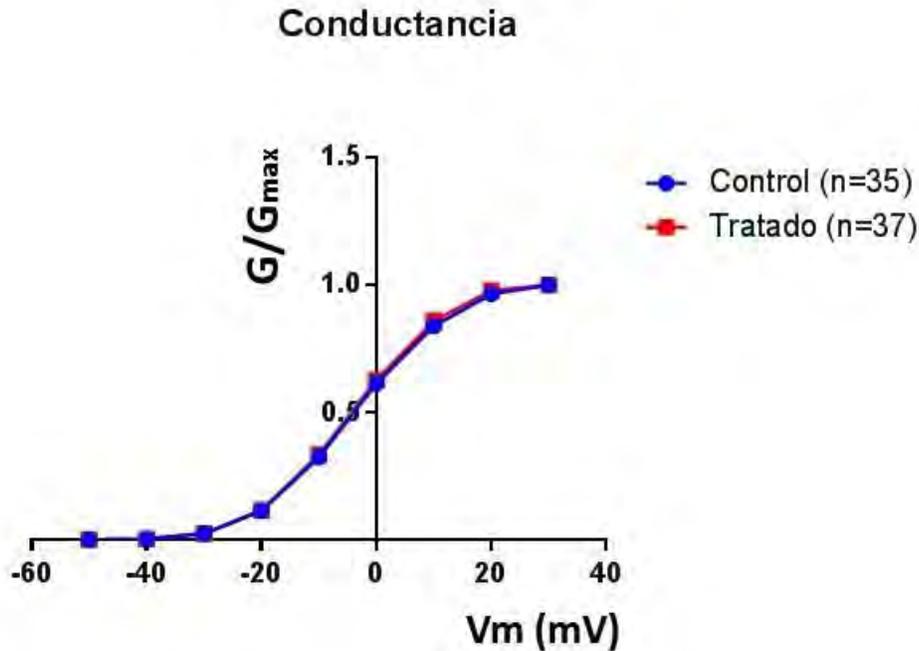


Figura 5 Dependencia de voltaje de la activación de las corrientes de sodio en células β aisladas del grupo control y tratado.

Inactivación de estado estacionario

En la figura 6A se muestran los trazos representativos de las corrientes de sodio obtenidas mediante un protocolo de doble pulso en células β de ambos grupos experimentales. Este protocolo consistió en un prepulso de 50 milisegundos desde

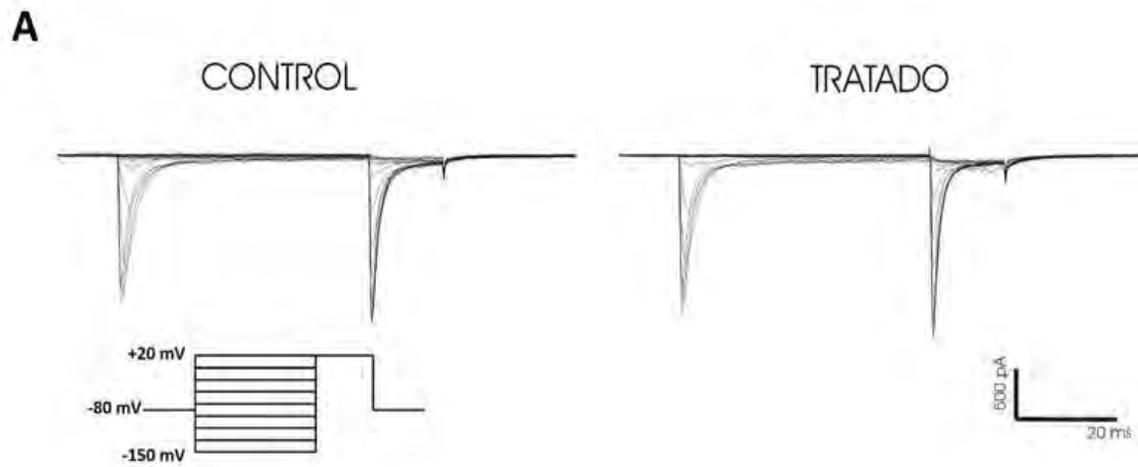
-150 mV hasta +20 mV seguido de un pulso de prueba a +20 mV, el cual tuvo una duración de 15 milisegundos.

Estos trazos se caracterizan por presentar dos conjuntos de corriente. El primer conjunto corresponde a las corrientes generadas por el prepulso durante 50 milisegundos, mientras que el segundo conjunto corresponde a las corrientes generadas por el pulso de prueba, siendo estas últimas las corrientes usadas en los siguientes análisis.

Las corrientes de sodio generadas por el pulso de prueba a +20 mV tienen una amplitud máxima alrededor de 800 pA en las células de ambos grupos. Esta amplitud es superior a la observada en la figura 4A debido a que la exposición a potenciales más hiperpolarizados (prepulso) libera a los canales de sodio de su estado de inactivación. Por lo tanto, en un potencial despolarizante (pulso de prueba), todos los canales de sodio de la célula se abren permitiendo un mayor flujo de corriente.

Por esa razón, la corriente generada por el pulso de prueba después de la exposición a un potencial de -150 mV es considerada como la corriente máxima a partir de la cual se normalizan las corrientes generadas en los demás potenciales del prepulso. Estas corrientes normalizadas fueron analizadas y ajustados con la ecuación de Boltzmann, obteniéndose la inactivación de estado estacionario de los canales de sodio en las células β de ambos grupos (figura 6B).

El potencial de membrana en el cual el 50% de los canales se inactiva ($V_{i0.5}$) no fue significativamente diferente entre las células β de ambos grupos (control $V_{i0.5} = -75.94 \pm 0.93$ mV vs tratado $V_{i0.5} = -77.79 \pm 0.88$ mV). Tampoco se observaron diferencias en la pendiente de la inactivación (k_i) entre ambos grupos (control $k_i = 12.32 \pm 0.2625$ mV vs tratado $k_i = 12.32 \pm 0.31$ mV).



B

Inactivación de estado estacionario

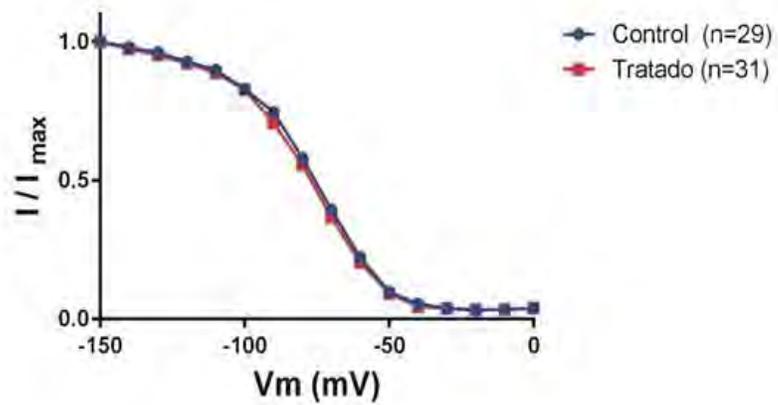


Figura 6 Inactivación de estado estacionario de los canales de sodio sensibles a voltaje en células β del grupo control y tratado. A) Familia de corrientes obtenida mediante un protocolo de doble pulso. B) Relación entre la I/I_{max} con el potencial de membrana en células β de ambos grupos.

Participación de las corrientes de sodio en la secreción de insulina estimulada por glucosa

Con el fin de analizar el efecto del síndrome metabólico sobre las corrientes de Na^+ , en el proceso de secreción de insulina se realizaron ensayos hemolíticos inversos en presencia o ausencia del bloqueador tetrodotoxina (200 nM).

Índice de secreción

En ausencia de TTX, las células β del grupo tratado tienen un mayor índice de secreción de insulina en concentraciones basales (5.6 mM) y estimuladoras (15.6 mM) de glucosa, comparadas con las células β del grupo control (figura 7). Esto nos indica que la capacidad secretora de las células β del grupo tratado se encuentra aumentada.

En presencia de TTX (200 nM), las células β de ambos grupos mostraron una disminución en el índice de secreción de insulina, únicamente en concentraciones estimuladoras de glucosa. El porcentaje de disminución en el grupo control fue de $32.6 \pm 5.1\%$ y en el grupo tratado fue de $28.04 \pm 4.2\%$. Dichos porcentajes no fueron significativamente diferentes.

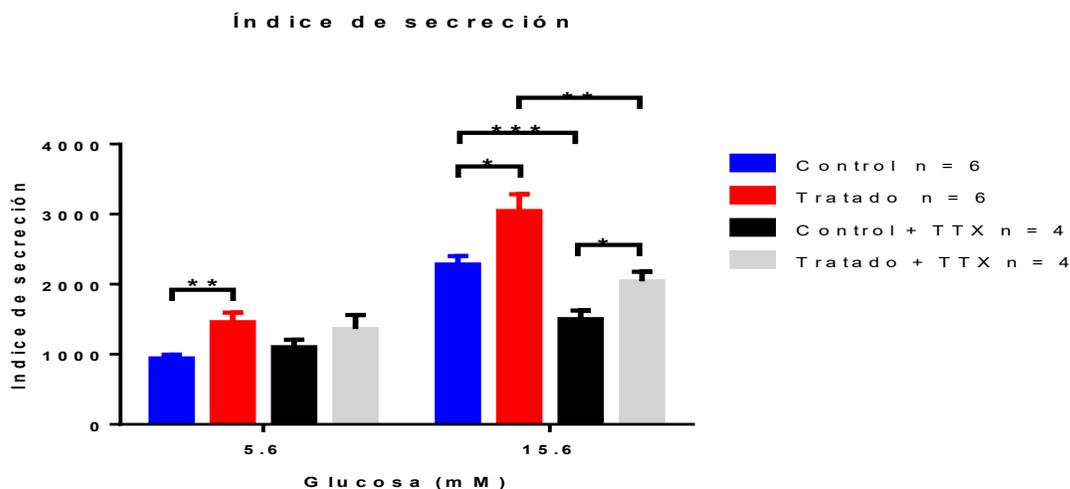


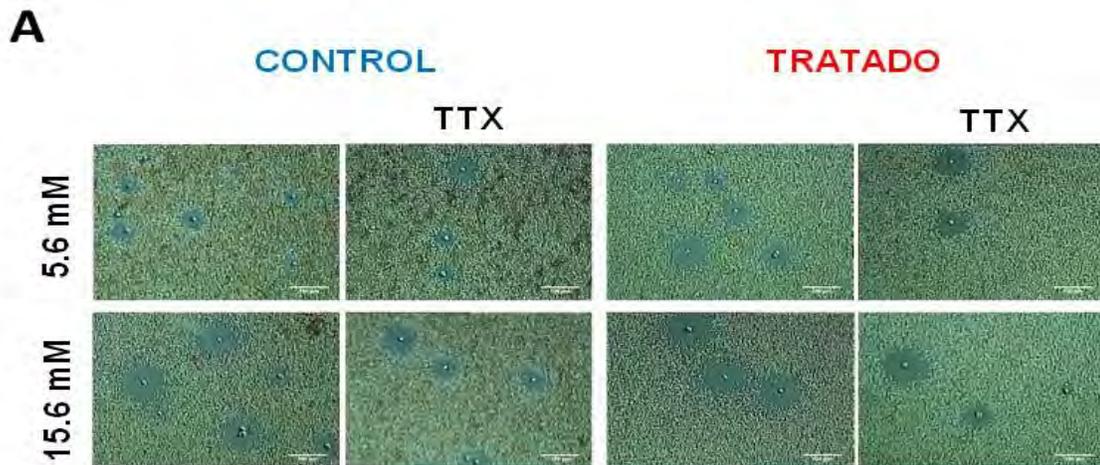
Figura 7 Índice de secreción de insulina en concentraciones basales y estimuladoras de glucosa. La n representa el número de ensayos hemolíticos inversos realizados, cada uno por duplicado. TTX = 200 nM. Los valores representan media \pm E. E. * Diferencia estadística $p < 0.05$. ** Diferencia estadística $p < 0.01$. *** Diferencia estadística $p < 0.001$.

Área de la inmunoplaca

En la figura 8A se muestran las inmunoplasmas formadas por las células β de cada grupo experimental en concentraciones basales y estimuladoras de glucosa, en presencia o ausencia del bloqueador TTX. Como se mencionó en la metodología, las inmunoplasmas se forman como resultado de la lisis mediada por el sistema de complemento de los eritrocitos cuyas membranas tuvieron complejos insulina/anticuerpo.

En la figura 8B se muestra la cuantificación realizada sobre dichas inmunoplasmas. En ausencia de TTX, el área promedio de las inmunoplasmas formadas por células β del grupo tratado fue significativamente mayor en concentraciones basales de glucosa. Sin embargo, en concentraciones estimuladoras no se observa una diferencia estadísticamente significativa.

El efecto de la incubación con TTX sobre la formación de inmunoplasmas fue únicamente perceptible en concentraciones estimuladoras de glucosa para las células β de ambos grupos. Incluso el efecto de la TTX fue tal que el área promedio de inmunoplaca generada en 15.6 mM de glucosa no es estadísticamente diferente del área promedio de inmunoplaca en 5.6 mM para ambos grupos experimentales.



Área secreción

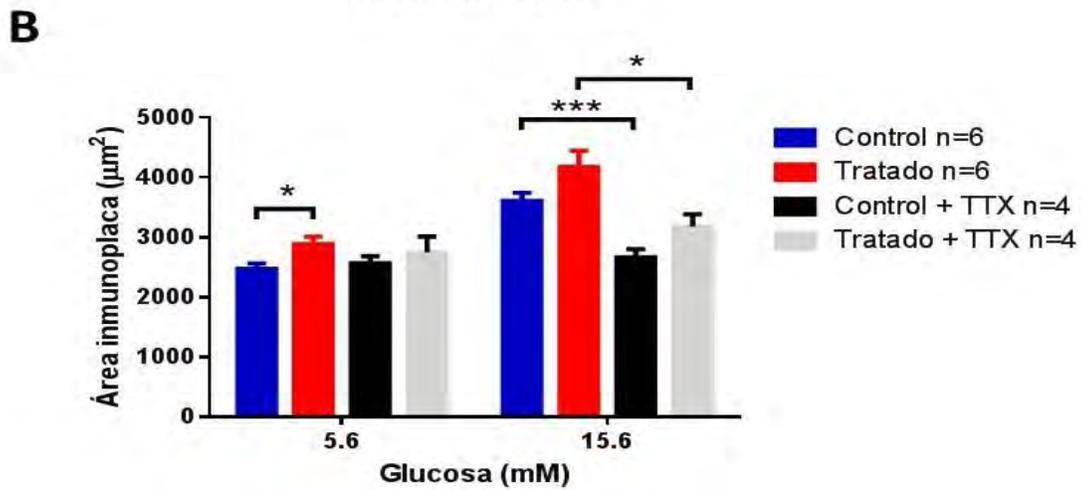


Figura 8 Área de la inmunoplaaca formada por la secreción de insulina. A) Se muestran imágenes representativas de las inmunoplaacas formadas por las células β de cada grupo en cada condición experimental. Escala = 100 μm . B) Cuantificación del área promedio de inmunoplaaca formada. Los valores representan media \pm E. E. M. La n representa el número de ensayos hemolíticos inversos realizados, cada uno por duplicado con aprox. 200 células analizadas por cámara. * Diferencia estadística $p < 0.05$. *** Diferencia estadística $p < 0.001$.

Distribución por frecuencia del área promedio de las inmunoplasmas

En la figura 9 se muestra la distribución por frecuencias del área promedio de las inmunoplasmas formadas por las células β de ambos grupos experimentales. De acuerdo a trabajos previos (Hiriart and Ramirez-Medeles, 1991) se consideraron como placas pequeñas (SP) a las inmunoplasmas cuya área promedio estuviera por debajo de $2000 \mu\text{m}^2$ y como placas grandes (LP) a aquellas cuya área promedio estuviera por arriba de $2000 \mu\text{m}^2$.

En la figura 9A se muestra la distribución de áreas de las inmunoplasmas formadas por las células β de ambos grupos en una concentración basal de glucosa. El porcentaje que representan las placas pequeñas y grandes se muestra en la figura 9E. En dicha condición, las células β del grupo tratado presentan un menor porcentaje de placas pequeñas y, complementariamente, un mayor porcentaje de placas grandes (figura 9E).

En la figura 9B la distribución de áreas corresponde a las inmunoplasmas generadas en una concentración estimulante de glucosa. Se puede observar que en estas concentraciones de glucosa, las células β del grupo tratado tienen una mayor frecuencia de inmunoplasmas con un área superior a $10\,000 \mu\text{m}^2$ que las células del grupo control. Sin embargo, cuando se considera el porcentaje total para placas pequeñas y grandes, según los criterios anteriormente mencionados, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (figura 9F).

La figura 9C corresponde a la distribución de áreas de inmunoplasmas generadas en una concentración basal de glucosa y en presencia del bloqueador TTX. El porcentaje que representan las placas pequeñas y grandes no es diferente entre las células β de ambos grupos experimentales (figura 9E).

En la figura 9D se muestra la distribución de áreas de las inmunoplasmas generadas en una concentración estimulante de glucosa y en presencia de TTX. De manera interesante, el efecto de la TTX fue notorio sobre las inmunoplasmas con un área superior a $10\,000 \mu\text{m}^2$, ya que estas desaparecen en las células β de ambos grupos experimentales. Sin embargo, únicamente en el caso de las células β del grupo

control se observó una diferencia significativa entre el porcentaje de áreas pequeñas y grandes con respecto a las células control sin TTX (figura 9F).

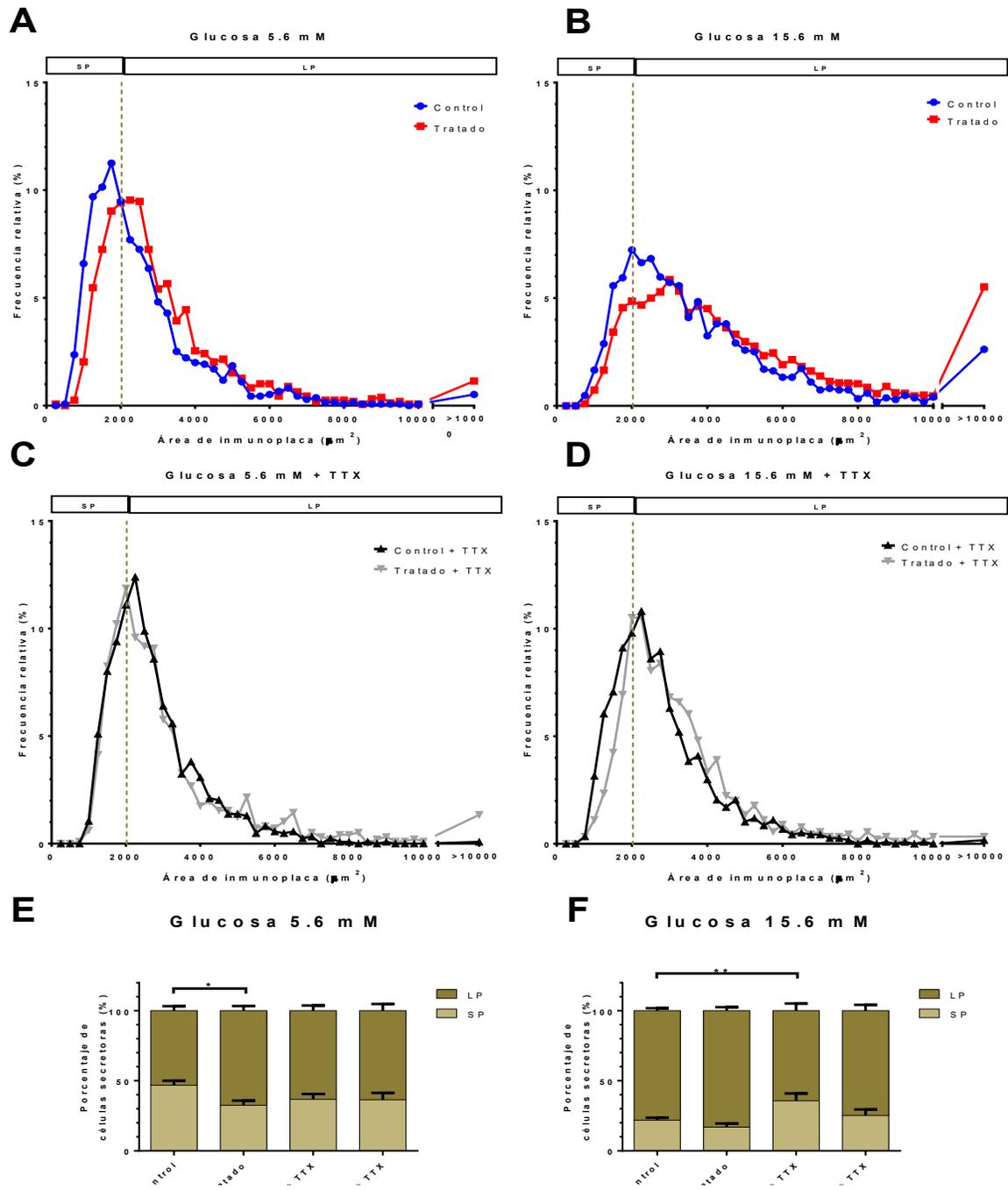


Figura 9 Distribución por frecuencias del área promedio de las inmunoplaquetas. Las inmunoplaquetas fueron clasificadas en plaquetas pequeñas (SP; $\leq 2000 \mu\text{m}^2$) y grandes (LP; $>2000 \mu\text{m}^2$) en glucosa 5.6 mM (A), 15.6 mM (B), 5.6 mM + TTX (C) y 15.6 mM + TTX (D). Comparación del porcentaje que representan las plaquetas LP y SP en 5.6 mM (E) y 15.6 mM (F). Los valores representan media \pm E. E. M. * Diferencia estadística $p < 0.05$. ** Diferencia estadística $p < 0.01$.

Fracción de células secretoras

En la figura 10 se muestran las fracciones de células β secretoras para ambos grupos experimentales cuando son incubadas en concentraciones basales y estimuladoras de glucosa en presencia o ausencia de TTX. En ausencia de TTX, se observa que el grupo tratado tienen una mayor fracción de células secretoras en ambas concentraciones de glucosa).

Por otra parte, el bloqueo de los canales de sodio con TTX únicamente disminuyó la fracción de células secretoras en concentraciones estimulantes de glucosa para ambos grupos experimentales. Sin embargo, a pesar del efecto de la TTX, el grupo tratado mantiene una mayor fracción de células secretoras.

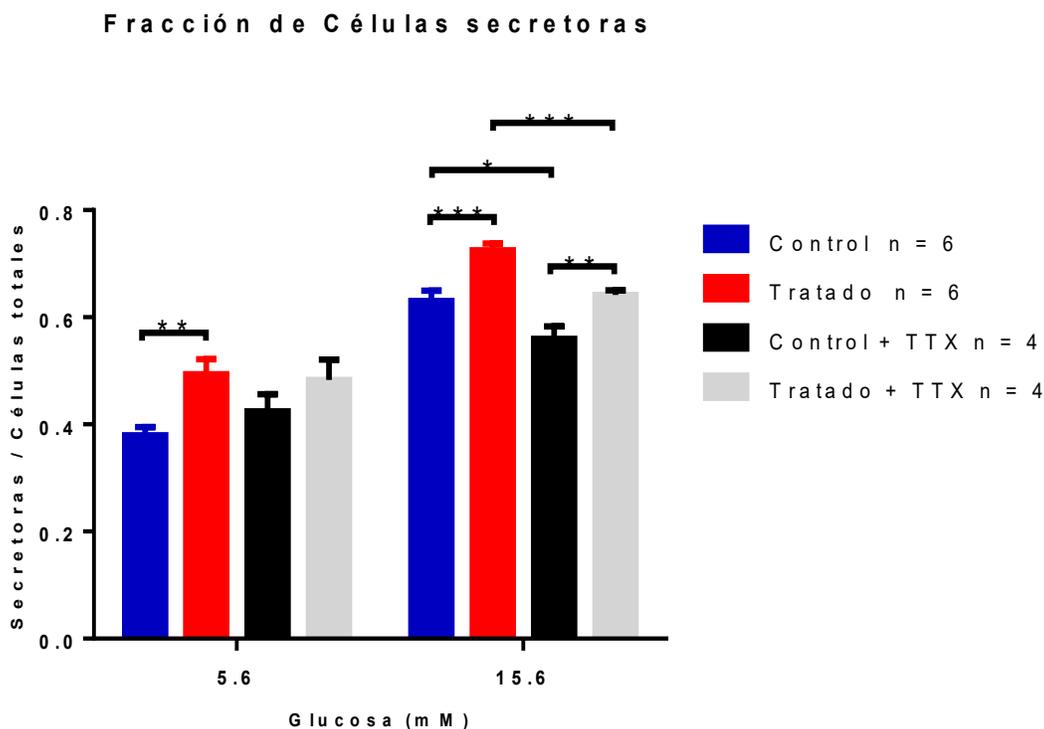


Figura 10 Fracción de células secretoras en concentraciones basales (5.6 mM) y estimulantes de glucosa (15.6 mM), en presencia o ausencia de TTX = 200 nM. Los valores representan media \pm E. E. M. La n representa el número de ensayos hemolíticos inversos realizados, cada uno por duplicado con aprox. 200 células analizadas por cámara. * Diferencia estadística $p < 0.05$. ** Diferencia estadística $p < 0.01$. *** Diferencia estadística $p < 0.001$.

Cuantificación de la presencia de los canales de sodio en las células β

Con el fin de analizar la presencia de los canales de sodio en las células β , se realizaron co-inmunofluorescencias para detectar la subunidad $\alpha 1.7$ ($\text{Na}_{v1.7}$) del canal de sodio e insulina (figura 11A). Se cuantificó la intensidad de fluorescencia correspondiente al anticuerpo secundario específico contra el anticuerpo $\alpha\text{-Na}_{v1.7}$.

Dicha intensidad se relaciona con la cantidad de canales presentes en las células β . En la figura 11B se muestra el promedio de la intensidad de fluorescencia en las células β de ambos grupos y en la cual no se observan diferencias estadísticamente significativas.

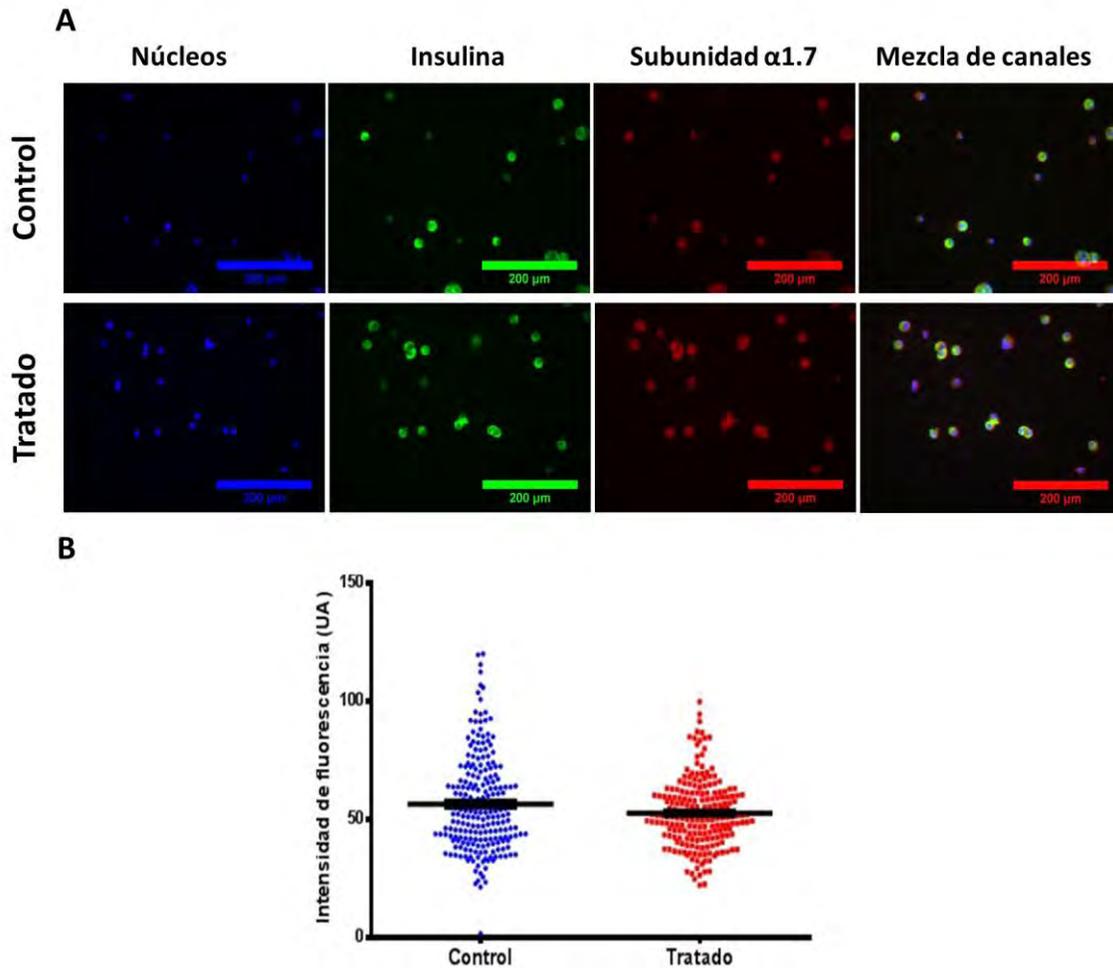


Figura 11 Inmunofluorescencias de la subunidad α del canal de sodio en células β de animales control y tratados. A) Imágenes representativas de las inmunofluorescencias realizadas en células β de ambos grupos. La barra de escala es igual a 200 μm . B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia. Los datos representan media \pm E. E. M. $n = 3$ experimentos que consistieron en pools de células β obtenidas de 6 animales control y 6 tratados. UA = Unidades arbitrarias.

Efectos del síndrome metabólico sobre las corrientes de calcio

Densidad de corriente de calcio

Complementario al análisis realizado sobre los canales de sodio, nos interesó observar si el tratamiento con sacarosa 20% por 8 semanas tenía efectos sobre otros canales importantes en el proceso de secreción, los canales de calcio sensibles a voltaje.

Se utilizó un protocolo de rampa de -80 a +80 mV, con una duración de 480 ms, para registrar las corrientes de calcio. La capacitancia de las células utilizadas para el registro de dichas corrientes no fue estadísticamente diferente (control = 6.57 ± 0.14 pF vs tratado = 6.58 ± 0.21 pF).

En la figura 12A se muestran registros representativos de las corrientes de calcio obtenidas con el protocolo de rampa, las cuales están normalizadas por la capacitancia de las células. Por lo tanto, lo que se observa es la densidad de corriente de calcio en función del voltaje (relación I-V) en células β de ambos grupos.

Las corrientes de calcio en las células β de ambos grupos muestran una activación notoria en un potencial de -30 mV, con dos corrientes máximas: una alrededor de -10 mV, mientras que la otra alrededor de +15 mV, las cuales es muy probable que correspondan a corrientes de calcio tipo T y L, respectivamente.

Tomando esto en cuenta, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las corrientes máximas de calcio en -10 mV (probablemente corrientes de calcio tipo T) entre las células β de ambos grupos (control = 13.7 ± 1.3 pA vs tratado = 17.1 ± 1.5 pA). Sin embargo, la corriente máxima de calcio en +15 mV (corriente de calcio tipo L) fue mayor en las células β del grupo tratado comparadas con las del grupo control (control = 24.2 ± 3.6 pA vs 36.73 ± 4.6 pA).

Adicionalmente, cuando se compara la relación de corriente – voltaje mediante el enfoque de área bajo la curva, se observa que la densidad de corriente de calcio fue mayor en las células β del grupo tratado con respecto a aquellas del grupo control (figura 12B).

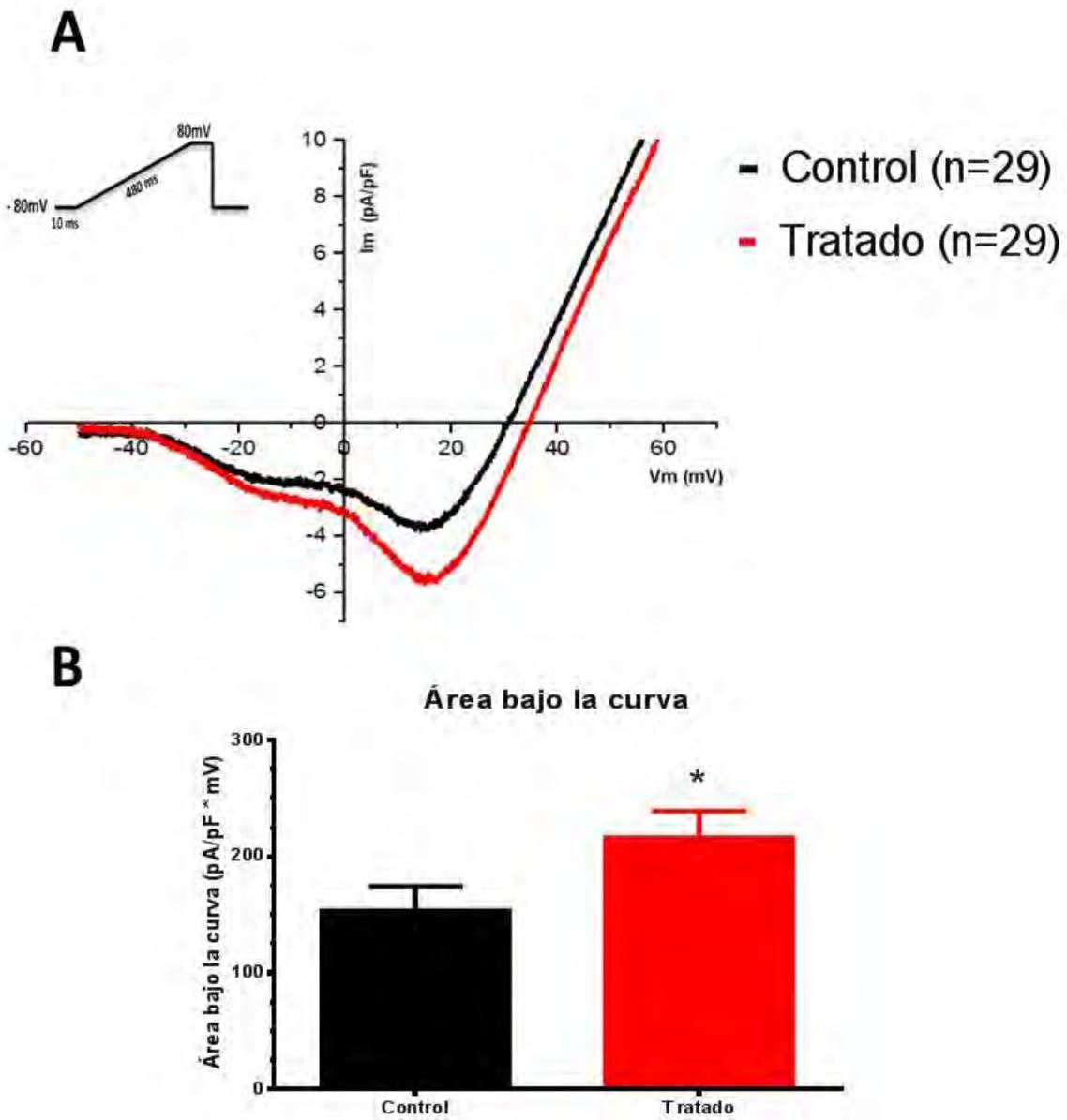


Figura 12 Densidad de corriente de calcio en células β . A) Registros representativos de las corrientes de calcio obtenidas con el protocolo de rampa, normalizadas por la capacitancia promedio de las células β . B) Análisis del área bajo la curva de la relación corriente – voltaje para cada condición experimental. Los valores representan media \pm E. E. M. * Diferencia estadística $p < 0.05$.

Participación de las corrientes de Ca²⁺ en la secreción de insulina estimulada por glucosa

Con el fin de analizar el efecto del síndrome metabólico sobre las corrientes de calcio en el proceso de secreción de insulina, se realizaron ensayos hemolíticos inversos en presencia o ausencia del bloqueador de canales de calcio tipo L nifedipina (5 μ M).

Índice de secreción

Los efectos presentados en ausencia de nifedipina (figura 13) han sido descritos anteriormente (figura 7). Estos constan de un mayor índice de secreción de insulina en las células β del grupo tratado, comparadas con las células del grupo control, en concentraciones basales y estimuladoras de glucosa.

Como se puede apreciar en la figura 7, la nifedipina tuvo efecto sobre el índice de secreción en concentraciones basales y estimuladoras de glucosa para las células β de ambos grupos experimentales. En glucosa basal (5.6 mM) el índice de secreción en las células β del grupo control disminuyó un $63.6 \pm 8.1\%$, mientras que el índice de secreción en células β del grupo tratado disminuyó un $73.9 \pm 8.2\%$. Dichos porcentajes de disminución no fueron estadísticamente diferentes.

Mientras tanto, en glucosa estimuladora (15.6 mM) el índice de secreción en las células β del grupo tratado disminuyó un $79.5 \pm 4.2\%$ mientras que el índice de secreción en células β del grupo control disminuyó un $83.1 \pm 3\%$. Dichos porcentajes de disminución tampoco fueron estadísticamente diferentes.

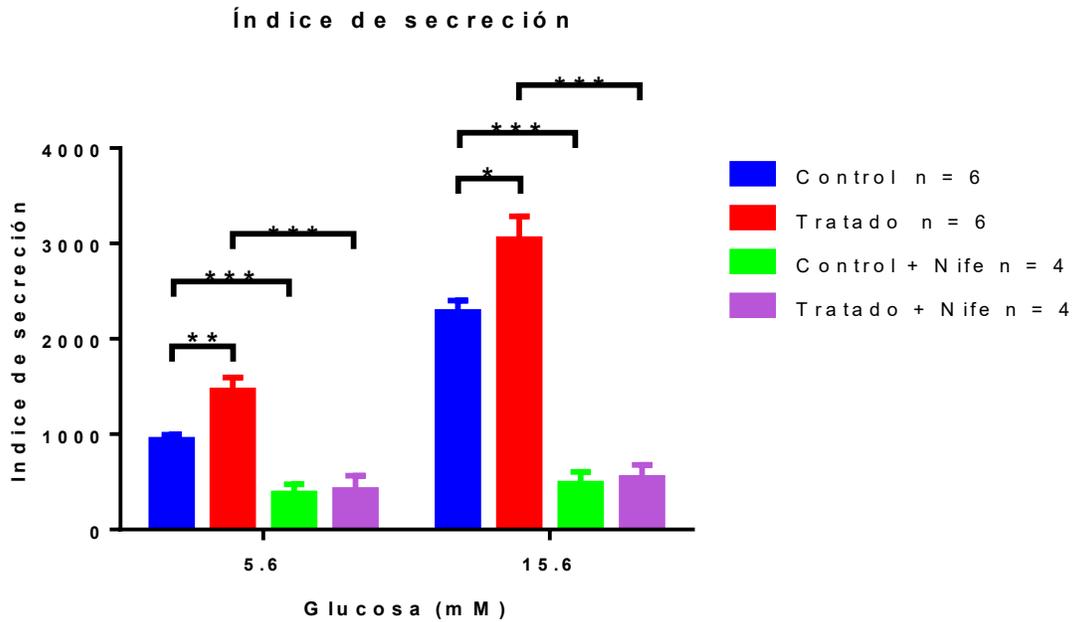


Figura 13 Índice de secreción de insulina en concentraciones basales y estimulatorias de glucosa. La n representa el número de ensayos hemolíticos inversos realizados, cada uno por duplicado. Nife = 5 μ M. Los valores representan media \pm E. E. * Diferencia estadística $p < 0.05$. ** Diferencia estadística $p < 0.01$. *** Diferencia estadística $p < 0.001$.

Área de la inmunoplaca

En la figura 14A se muestran las inmunoplasmas formadas por las células β de cada grupo experimental en concentraciones basales y estimulatorias de glucosa, en presencia o ausencia del bloqueador nifedipina. En dichas imágenes, es muy notorio el efecto de la nifedipina sobre el área de la inmunoplaca tanto en células β del grupo control y tratado.

Los efectos presentados en ausencia de nifedipina (figura 14B) han sido descritos anteriormente (figura 8B). Estos constan de un área promedio de las inmunoplasmas formadas por células β del grupo tratado significativamente mayor en concentraciones basales de glucosa comparadas con aquellas de células β del grupo control.

El efecto de la incubación con nifedipina sobre el área promedio de inmunoplasmas fue perceptible en ambas concentraciones de glucosa para las células β de ambos grupos. Sin embargo, el área promedio de las inmunoplasmas formadas por células

β del grupo tratado no fue significativamente diferente con respecto a aquella de células del grupo control en ninguna de las concentraciones de glucosa usadas.

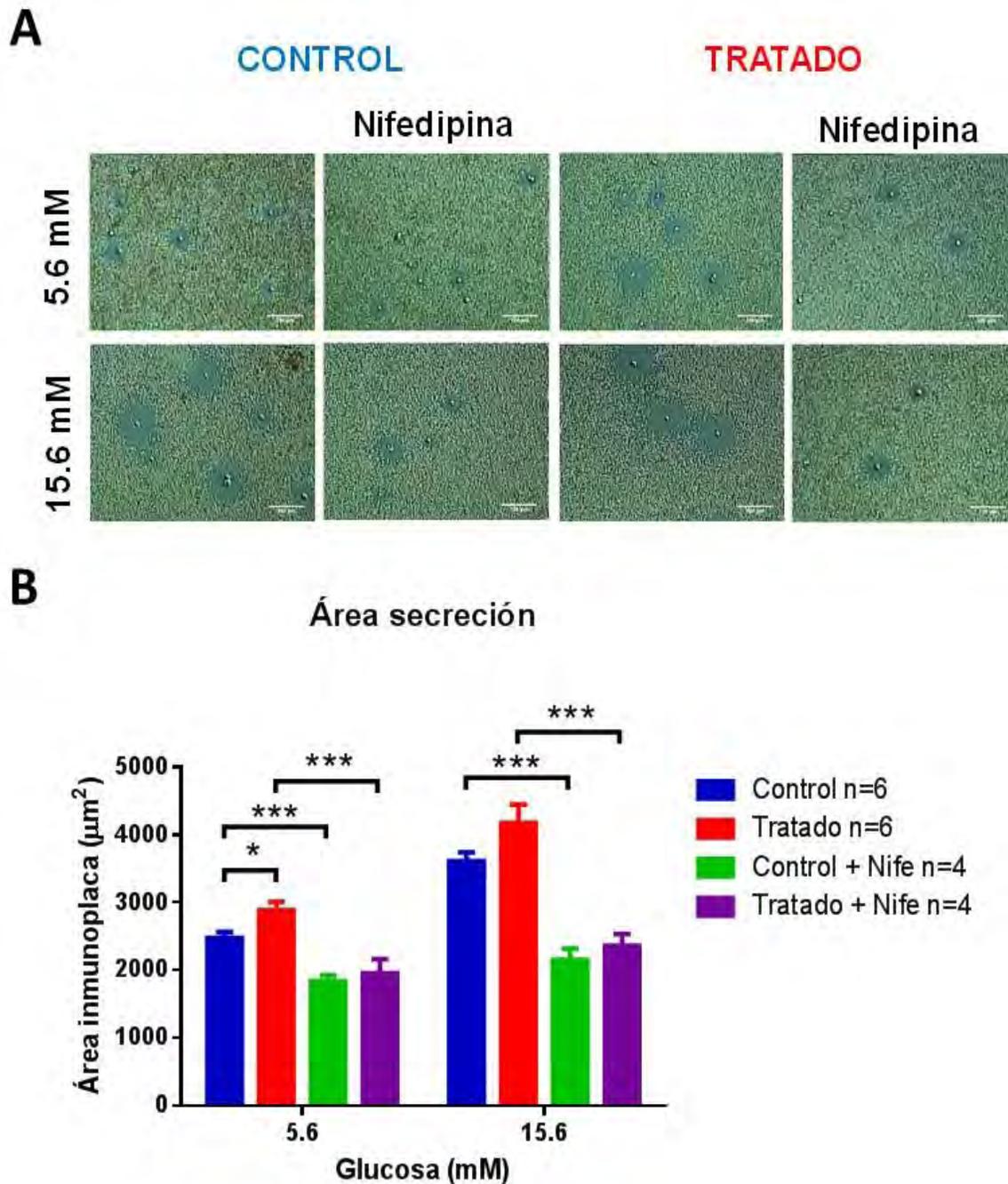


Figura 14 Área de la inmunoplaaca formada por la secreción de insulina. A) Imágenes representativas de las placas formadas para cada condición. Escala = 100 μm . B) Cuantificación del área promedio de inmunoplaaca formada. Los valores representan media \pm E. E. M. La n representa el número de ensayos hemolíticos inversos realizados, cada uno por duplicado con aprox. 200 células analizadas por cámara. * Diferencia estadística $p < 0.05$. ** Diferencia estadística $p < 0.01$. *** Diferencia estadística $p < 0.001$.

Distribución por frecuencia del área promedio de las inmunoplasmas

Las figuras 15A y 15B corresponden a la distribución por frecuencias de las áreas de las inmunoplasmas generadas por células β de ambos grupos experimentales en una concentración basal y estimuladora de glucosa, respectivamente. Como se describió previamente (figura 9A y 9B), en una concentración basal de glucosa se observa que las células β del grupo tratado presentan un menor porcentaje de placas pequeñas y por ende un mayor porcentaje de placas grandes. Mientras que en una concentración estimuladora no se observaron diferencias.

La figura 15C corresponde a la distribución por frecuencias de las áreas de inmunoplasmas generadas en una concentración basal de glucosa y en presencia del bloqueador nifedipina. En dicha condición se observa un notorio aumento del porcentaje correspondiente a placas pequeñas, es decir $< 2\ 000\ \mu\text{m}^2$, en las células β de ambos grupos comparados con sus respectivos sin nifedipina (figura 15E). Complementario a este aumento en las placas pequeñas, se observa una disminución del porcentaje de placas grandes.

Sin embargo, cuando el porcentaje de placas pequeñas generadas por células β del grupo tratado en una concentración basal de glucosa y en presencia de nifedipina se compara con el correspondiente al del grupo control en las mismas condiciones no se observan diferencias estadísticamente significativas (figura 15E).

La figura 15D muestra la distribución por frecuencias de las áreas de inmunoplasmas generadas en una concentración estimuladora de glucosa y en presencia del bloqueador nifedipina. El efecto de la nifedipina en esta condición fue similar al observado en una concentración basal de glucosa, es decir que hubo un notorio aumento del porcentaje correspondiente a placas pequeñas generadas por células β de ambos grupos experimentales cuando estas son comparadas con sus respectivos sin nifedipina (figura 15F).

Sin embargo, cuando el porcentaje de placas pequeñas generadas por células β del grupo tratado en una concentración estimuladora y en presencia de nifedipina se

compara con el correspondiente al del grupo control en las mismas condiciones no se observan diferencias estadísticamente significativas (figura 15F).

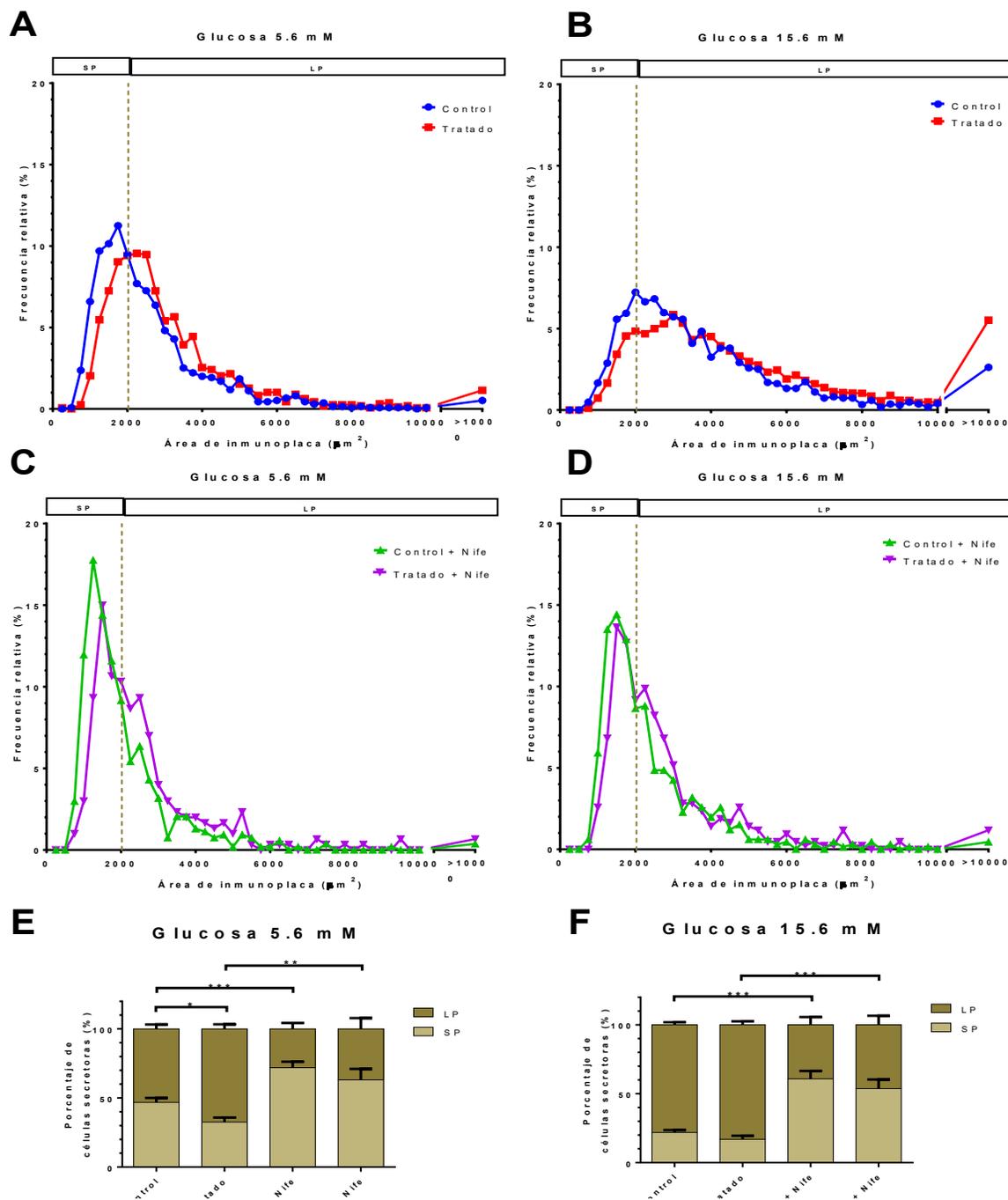


Figura 15 Distribución por frecuencias del área promedio de las inmunoplaquetas. Las inmunoplaquetas fueron clasificadas en plaquetas pequeñas (SP; $\leq 2000 \mu\text{m}^2$) y grandes (LP; $>2000 \mu\text{m}^2$) en glucosa 5.6 mM (A), 15.6 mM (B), 5.6 mM + nifedipina (C) y 15.6 mM + nifedipina (D). Comparación del porcentaje que representan las plaquetas LP y SP en 5.6 mM (E) y 15.6 mM (F). Los valores representan media \pm E. E. M. * Diferencia estadística $p < 0.05$. ** Diferencia estadística $p < 0.01$.

Fracción de células secretoras

En la figura 16 se muestran las fracciones de células β secretoras para ambos grupos experimentales cuando son incubadas en concentraciones basales y estimuladoras de glucosa en presencia o ausencia de nifedipina. Como se describió anteriormente (figura 10), en ausencia de nifedipina se observa que el grupo tratado tiene una mayor fracción de células secretoras en ambas concentraciones de glucosa.

Por otra parte, el bloqueo de los canales de calcio tipo L con nifedipina disminuyó la fracción de células secretoras en concentraciones basales y estimulantes de glucosa para ambos grupos experimentales (figura 16). Sin embargo, en ninguna de las concentraciones de glucosa se observaron diferencias en la fracción de células secretoras en presencia de nifedipina del grupo tratado a pesar del efecto de la TTX, el grupo tratado mantiene una mayor fracción de células secretoras.

Sin embargo, no se observan diferencias estadísticamente significativas cuando las fracciones de células secretoras en ambas concentraciones de glucosa y en presencia de nifedipina del grupo tratado se comparan con las del grupo control en las mismas condiciones (figura 16).

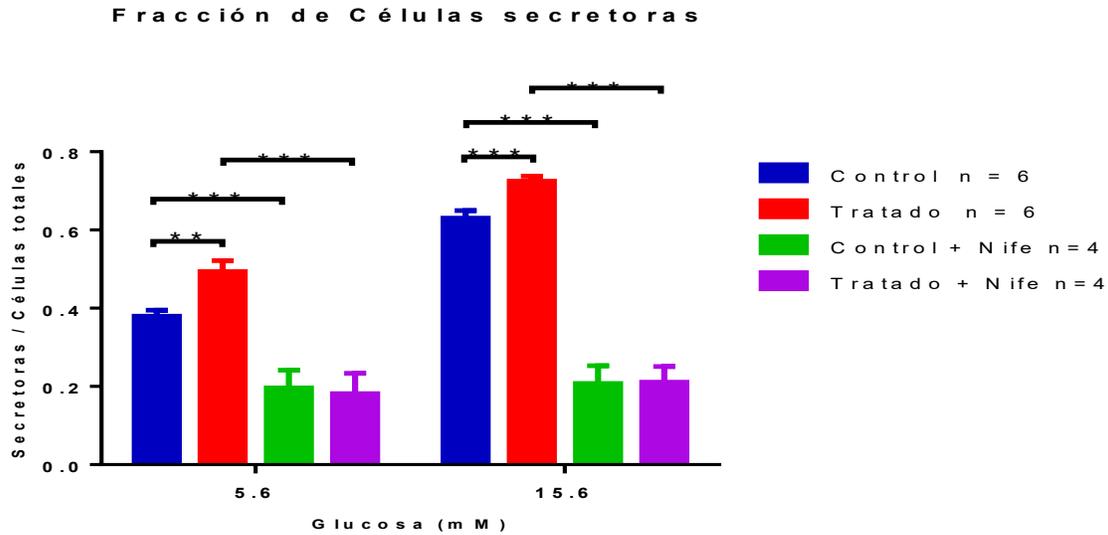


Figura 16 Fracción de células secretoras en concentraciones basales (5.6 mM) y estimulantes de glucosa (15.6 mM), en presencia o ausencia de nifedipina = 5 μ M. Los valores representan media \pm E. E. La n representa el número de ensayos hemolíticos inversos realizados, cada uno por duplicado con aprox. 200 células analizadas por cámara. ** Diferencia estadística $p < 0.01$. *** Diferencia estadística $p < 0.001$.

Tamaño de las células β pancreáticas

Con la intención de analizar posibles efectos de la administración con sacarosa 20% durante 8 semanas sobre el tamaño de las células β , se cuantificó el área de las células que formaron inmunoplasmas en los ensayos hemolíticos inversos (figura 17).

El área promedio de las células β del grupo tratado fue significativamente mayor al área de las células β del grupo control en ambas concentraciones de glucosa usadas. Sin embargo, cuando se comparó el área promedio de las células β del grupo tratado obtenidas en ambas concentraciones de glucosa no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

Tamaño celular

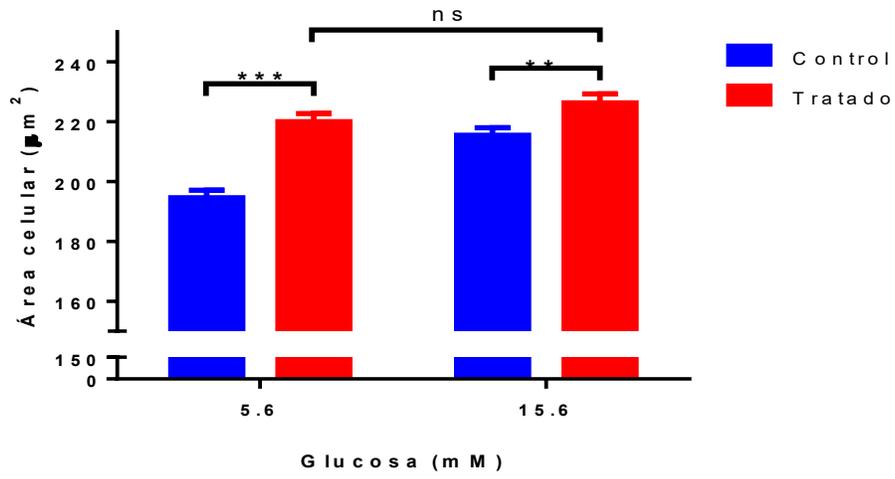


Figura 17 Área celular en concentraciones basales y estimulantes de glucosa. Los valores representan media \pm E. E. M. n = 250 células para cada condición experimental. ns = Sin diferencia estadística. ** Diferencia estadística $p < 0.01$. *** Diferencia estadística $p < 0.001$.

DISCUSIÓN

La administración de sacarosa al 20% en el agua de consumo durante 8 semanas utilizada en este trabajo provocó que los animales bajo este esquema aumentaran de peso, lo cual se asoció con un incremento en el perímetro abdominal y con mayores depósitos de tejido adiposo epididimal y peripancreáticos. Adicionalmente, se desarrolló intolerancia a la glucosa, hipertrigliceridemia e hiperinsulinemia.

Estos resultados reproducen lo reportado por nuestro equipo de trabajo (Larqué *et al.*, 2011), confirmando que la administración con sacarosa 20% durante 8 semanas funciona como modelo animal de síndrome metabólico. Sin embargo, comparado con otros modelos animales que consisten en un alto aporte calórico por carbohidratos (Pagliassotti and Prach, 1995; Gonzalez *et al.*, 2013; Aydin *et al.*, 2014), en nuestro modelo no se observó resistencia a la insulina ni cambios en la concentración de glucosa en ayuno.

Previamente nuestro equipo de trabajo observó una mayor concentración de glucosa en ayuno y resistencia a la insulina cuando la administración con sacarosa 20% se extiende a un periodo de 24 semanas (Velasco *et al.*, 2012). Por lo tanto, esto sugiere que el modelo de 8 semanas de administración con sacarosa 20% puede considerarse como un modelo de las primeras etapas de desarrollo del síndrome metabólico.

La hiperinsulinemia observada en los animales con síndrome metabólico puede ser parte del mecanismo que explique el mantenimiento de la normogluceemia en ayuno. Sin embargo, diversos autores han propuesto que la hiperinsulinemia es una de las primeras respuestas generadas por las células β ante el desarrollo de resistencia a la insulina (Weir and Bonner-Weir, 2004; Poitout *et al.*, 2010). Esto último contrasta con nuestros resultados, puesto que no observamos diferencias en la sensibilidad a la insulina entre los animales de ambos grupos experimentales mediante las pruebas intraperitoneales.

Durante dicha prueba intraperitoneal los niveles de glucosa inicial no alcanzan los niveles basales. Esto puede deberse al periodo de ayuno de toda una noche al que fueron sometidos los animales, el cual aunado a la administración de insulina, complicaría una respuesta optima del organismo por retomar la glucemia basal. En torno a esto, existen autores que sugieren el uso de un ayuno de 6 horas (Ayala *et al.*, 2010), ya que un ayuno mayor significa un estrés metabólico en el que el glucógeno hepático se ve seriamente reducido.

A pesar de que la prueba intraperitoneal de sensibilidad a la insulina es una herramienta muy usada, no existe consenso sobre un protocolo particular para llevarla a cabo debido a la gran cantidad de factores a tomar en cuenta (Bowe *et al.*, 2014). Uno de ellos es la dosis de insulina a usar, la cual en este trabajo fue inferior a lo reportado respecto a otros estudios en los que se usaron otros roedores (Bowe *et al.*, 2014; Vinué and González-navarro, 2015).

Sin embargo, esta dosis no podría considerarse como la razón de una falta de cambio en la sensibilidad a la insulina de los animales tratados de este trabajo, ya que incluso se ha reportado que un ayuno de toda una noche incrementa la sensibilidad a la insulina en roedores (Ayala *et al.*, 2006), por lo que una mayor dosis de insulina conllevaría a poner en riesgo al animal. Por lo tanto, a reserva de usar otro método de análisis de la sensibilidad a la insulina, nuestro resultado respecto a la ausencia de resistencia a esta hormona sería sólido.

Por otra parte, la progresión temporal de la resistencia a la insulina se desarrolla primero en hígado y posteriormente en musculo esquelético (Stewart *et al.*, 2009; Kraegen *et al.*, 2010). Por lo tanto, es posible que una resistencia a la insulina únicamente en hígado durante las primeras etapas del síndrome metabólico sea parte del mecanismo que provoque una compensación por parte de las células β , repercutiendo en la hiperinsulinemia observada. Por dicha razón, queda pendiente analizar la sensibilidad a la insulina específica de cada tejido en nuestro modelo de síndrome metabólico.

Los mecanismos que conllevan al desarrollo de la hiperinsulinemia han sido tema de intensa investigación durante varios años. Sin embargo, hoy día se pueden proponer tres mecanismos que expliquen esta condición: 1) disminución en el proceso de degradación fisiológica de la insulina, 2) aumento de la masa de células β y 3) aumento en la capacidad secretora de las células β .

La degradación de la insulina se ha reportado estar disminuida en modelos animales sometidos a dietas altas en grasa (Mittelman *et al.*, 2000) y en humanos con diferentes grados de obesidad (Erdmann *et al.*, 2009; Marini *et al.*, 2014). Por lo tanto, si hay una disminución en la degradación de insulina que explique la hiperinsulinemia observada en este trabajo deberá ser investigada en futuros estudios.

Diversos grupos de investigación han reportado el aumento de la masa de las células β pancreáticas en distintos modelos animales de síndrome metabólico (Finegood *et al.*, 2001; Gonzalez *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2016). Se ha propuesto que este aumento se debe principalmente por, ya sea un aumento en la proliferación de las células (hiperplasia) y/o por un aumento en el tamaño celular (hipertrofia) (Ackermann and Gannon, 2007).

Previamente en nuestro modelo de síndrome metabólico no se reportaron cambios estadísticamente significativos en la masa de las células β pancreáticas (Larqué *et al.*, 2011). Sin embargo, en el actual trabajo se observó un aumento significativo en el tamaño de las células β pancreáticas de animales con síndrome metabólico, lo cual concuerda con lo reportado por varios autores (Chan *et al.*, 1999, 2002; Gonzalez *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2014).

En conjunto, la falta de cambios en la masa y el aumento en el tamaño de las células β sugieren una disminución en el número de células β durante las primeras etapas de desarrollo del síndrome metabólico que deberá ser analizada con mayor profundidad en futuros estudios.

Por otra parte, la hipertrofia de las células β se ha asociado con el efecto conjunto de la glucosa e insulina (Paris *et al.*, 2003) y la vía PI3K-Akt-S6K se propone como

la explicación molecular de este efecto (Bernal-Mizrachi and Wen, 2001; Kozma and Thomas, 2002; Ruvinsky *et al.*, 2005), lo cual establece a esta vía como un futuro objetivo de estudio que complemente los resultados observados en el actual trabajo.

El tercer mecanismo que se propone para explicar el desarrollo de la hiperinsulinemia es el aumento en la capacidad secretora de las células β . Curiosamente, se ha reportado que entre mayor sea el tamaño de la célula β , mayor será su capacidad secretora (Giordano *et al.*, 1993), lo cual resalta el cambio en el tamaño de las células de animales con síndrome metabólico que observamos en este trabajo.

Los aumentos en la capacidad secretora de las células β han sido observados bajo distintos modelos de síndrome metabólico, los cuales pueden estar acompañados de un aumento en la masa de células β pancreáticas (Gonzalez *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2016) o presentarse de manera independiente (Ellenbroek *et al.*, 2013).

En este trabajo, observamos un aumento en el índice de secreción de las células β pancreáticas aisladas de animales con síndrome metabólico mediante el uso del ensayo hemolítico inverso en concentraciones basales (5.6 mM) y estimulatorias de glucosa (15.6 mM), lo cual se traduce como un aumento en la capacidad secretora de dichas células.

Entonces, la hiperinsulinemia desarrollada durante las primeras etapas del síndrome metabólico se debe al aumento en la capacidad secretora de las células β , relacionada a su vez con un mayor tamaño celular, sin que haya cambios en la masa de dichas células. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Chen *et al.*, 2016, en cuyo trabajo observaron que el aumento en la secreción de insulina precedía a los cambios en la masa de células β de ratones alimentados con dieta alta en grasa.

No obstante, los mecanismos a nivel celular que expliquen el aumento en la secreción de insulina en las células β necesitan de mayor investigación. Diversos autores han observado aumentos en los niveles de ARNm y proteína de GLUT2 en

modelos de obesidad, los cuales han sido paralelos con aumentos en la capacidad secretora de las células β (Kooptiwut *et al.*, 2002; Noriega-López *et al.*, 2007). Previamente, nuestro grupo de trabajo también reportó un aumento en los niveles proteicos de GLUT2 durante las primeras etapas del desarrollo del síndrome metabólico (Larqué *et al.*, 2011).

Por otra parte, en un modelo animal de etapas crónicas del síndrome metabólico desarrollado por nuestro equipo de trabajo, el cual consistió en la administración con sacarosa 20% durante 24 semanas, se observó que los canales K_{ATP} tenían una mayor sensibilidad a dicho nucleótido. También se observaron subpoblaciones funcionales de células β , con base en la heterogeneidad de las corrientes de calcio a través de los canales sensibles a voltaje. Ambos resultados se propusieron como parte del mecanismo que explicara una mayor secreción de insulina (Velasco *et al.*, 2012).

Entonces, los cambios en el GLUT2, canales K_{ATP} y en canales de calcio sensibles a voltaje sugieren que el síndrome metabólico tiene efectos sobre el componente proteico que acopla el estímulo de glucosa con la secreción de insulina. Con el fin de profundizar en los mecanismos que expliquen el aumento en la capacidad secretora de la célula durante el síndrome metabólico, se decidió analizar los posibles efectos que tenía este último sobre otros componentes proteicos importantes en dicho proceso de secreción como lo son canales de sodio sensibles a voltaje.

Debido a que el influjo de sodio forma parte del proceso de despolarización del potencial de membrana de la célula β durante la secreción de insulina (Hiriart and Aguilar-Bryan, 2008), esperábamos que la corriente de este ion estuviera incrementada en las células β de animales con síndrome metabólico. Un posible aumento en la corriente de sodio puede explicarse por un amplio rango de alteraciones en las propiedades biofísicas de la activación e inactivación de los canales de sodio sensibles a voltaje (Chadda *et al.*, 2017).

Por tal razón, se analizaron la densidad de corriente de sodio, la dependencia de voltaje de la activación y la inactivación de estado estacionario de los canales de sodio. De manera interesante, en ninguno de estos parámetros se observaron diferencias significativas en las células β de animales con síndrome metabólico comparadas con aquellas de animales controles.

Adicionalmente, aunque el bloqueador de canales de sodio TTX disminuyó la secreción de insulina observada en concentraciones estimulantes de glucosa mediante el uso del ensayo hemolítico inverso, esta lo hizo con la misma intensidad en las células β de animales con y sin síndrome metabólico. Es decir que, después de la incubación con TTX, se siguió observando una mayor secreción en las células β de animales con síndrome metabólico, lo cual excluye una mayor participación de los canales de sodio.

Finalmente, las inmunofluorescencias hechas para la subunidad α 1.7 del canal de sodio no mostraron diferencias en la presencia de esta proteína entre células β de animales con y sin síndrome metabólico. En resumen, durante las primeras etapas del desarrollo del síndrome metabólico, no hay cambios en las propiedades electrofisiológicas, participación en la secreción de insulina y expresión de los canales de sodio sensibles a voltaje, lo cual contrasta totalmente con la hipótesis planteada.

Aunque los canales de sodio sensibles a voltaje son considerados como la principal ruta de ingreso de este ion hacia la célula, existen otras opciones como lo son los intercambiadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y Na^+/H^+ (Murphy and Eisner, 2009), así como el canal de fuga de sodio (NALCN por sus siglas en inglés, (Gilon and Rorsman, 2009)). Por lo tanto, no se puede descartar una participación de estas vías que repercutan en un mayor influjo de sodio y un efecto sobre la despolarización de la célula β .

Se ha reportado que el influjo de sodio hacia el citosol de la célula β se propaga hacia las mitocondrias a través del intercambiador mitocondrial de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCXL). Con dicho flujo, se regula la concentración de calcio mitocondrial, el cual tiene

efectos importantes sobre la síntesis de ATP y en la secreción de insulina (Nita *et al.*, 2012; Nita II *et al.*, 2014). Por lo tanto, queda pendiente analizar si durante las primeras etapas de desarrollo del síndrome metabólico existen efectos sobre el influjo de sodio hacia las mitocondrias.

En otro aspecto, se ha reportado que las células β presentan corrientes de sodio persistentes (I_{NaL}), las cuales se caracterizan por no inactivarse y por aumentar en condiciones de hiperglucemia (Rizzetto *et al.*, 2015). Este tipo de corriente se ha asociado con una disminución de la secreción de insulina y cuando es bloqueada con ranolazina se observa una mejora en dicho proceso de secreción (Ning *et al.*, 2011). Por consiguiente, será necesario esclarecer la relación entre el desarrollo temprano del síndrome metabólico y una posible disminución de la I_{NaL} como mecanismo que conlleve a la mejora en la secreción de insulina observada en este trabajo.

Recientemente, el influjo de iones sodio a través de los canales sensibles a voltaje ha sido identificado como regulador de la muerte celular inducida por citosinas, así como de la producción de insulina. Ya que el bloqueo de estos canales con el fármaco carbamazepina o la generación de una cepa mutante para la subunidad $\alpha 1.7$ del canal ($Scn9a^{-/-}$) han provocado una disminución de la apoptosis (Yang *et al.*, 2014) y un mayor contenido de insulina (Szabat *et al.*, 2015), respectivamente.

Dichas observaciones concuerdan con la idea de que un aumento en la concentración intracelular de sodio se asocia con un estado fisiopatológico de las células (Murphy and Eisner, 2009). El influjo de sodio hacia la célula β está regulado principalmente por la bomba de Na^+/K^+ (Nita *et al.*, 2015), por lo que un mayor influjo de sodio provocaría una mayor actividad de dicha bomba, traduciéndose en un mayor consumo de ATP que evitaría el bloqueo de los canales K_{ATP} , afectando la secreción de insulina (Ding and Kitasato, 1997).

La ausencia de cambios en la densidad de corriente de sodio observada en nuestro modelo de desarrollo temprano de síndrome metabólico quizá obedezca a una

fuerte regulación de la concentración intracelular de este ion que evite efectos adversos sobre la misma célula β . Previamente, nuestro equipo de trabajo observó un aumento en la densidad de corriente de sodio después de la administración con sacarosa 20% durante 24 semanas (datos no publicados), el cual puede considerarse como un efecto adverso en la célula β que conlleve a la hiperglucemia observada en dicho modelo animal.

Por lo tanto, un aumento en la densidad de corriente de sodio podría significar en realidad una célula β fisiopatológicamente comprometida y no una secreción de insulina mejorada, lo cual al final terminará repercutiendo en un pobre control de la homeostasis de la glucosa y a un consecuente desarrollo de diabetes mellitus.

Aunque los canales de sodio sensibles a voltaje son importantes en el proceso de secreción de insulina, nosotros observamos que esta solo disminuye parcialmente cuando las células β pancreáticas son incubadas con tetrodotoxina, lo cual reproduce lo anteriormente reportado (Hiriart and Matteson, 1988). Mientras tanto, cuando las células β son incubadas con el bloqueador de canales de calcio tipo L nifedipina, la secreción se ve fuertemente disminuida (Ohta *et al.*, 1993).

Dichas observaciones indican que los canales de calcio sensibles a voltaje tienen una mayor participación durante la secreción de insulina y por tal razón nos interesó analizar el efecto del desarrollo temprano del síndrome metabólico sobre este tipo de canales.

De manera interesante, observamos un mayor influjo de iones calcio a través de los canales sensibles a voltaje tipo L, lo cual concuerda con lo observado en otros modelos animales (Kato *et al.*, 1996; Velasco *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2016). Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el efecto de la nifedipina sobre la secreción de insulina de las células β aisladas de animales con y sin síndrome metabólico en ninguna concentración de glucosa considerada.

Esta ausencia de diferencias estadísticamente significativas puede deberse más a la considerable variación observada por un número limitado de experimentos realizados, por lo que se sugiere aumentar la n experimental con el fin de evitar falsos negativos.

Queda pendiente analizar si este aumento en la densidad de corriente de calcio se debe a un aumento en la cantidad de canales expresados en la membrana plasmática o si fue resultado de cambios en sus propiedades electrofisiológicas de activación e inactivación.

Un mayor influjo de iones calcio se asocia con el aumento en la concentración intracelular basal de dicho ion. Esta última condición se propone como parte del mecanismo que explique el incremento en la secreción de insulina en concentraciones basales de glucosa y la cual a su vez conlleva a la ausencia de una mayor secreción en concentraciones estimulantes (Minami *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2016).

Por lo tanto, durante las primeras etapas de desarrollo del síndrome metabólico se observan aumentos en el influjo de calcio, el cual puede tener un efecto potenciador de la secreción de insulina. Sin embargo, con el tiempo la concentración intracelular de este ion se verá aumentada pudiendo tener efectos tóxicos sobre la célula y consecuencias sobre el proceso de secreción de insulina.

Esto último concuerda con la existencia de células β con una densidad de corriente de calcio nula, la cual fue observada por nuestro equipo de trabajo en el modelo crónico de síndrome metabólico (Velasco *et al.*, 2012). Incluso en modelos animales de diabetes mellitus, las alteraciones en las concentraciones intracelulares de calcio se asocian con una pobre secreción de insulina (Roe *et al.*, 1996; Marie *et al.*, 2001).

Cabe mencionar que, aunque la extrusión del calcio del interior de la célula es en su mayoría llevada a cabo por la actividad que tiene la bomba de calcio dependiente de ATP en el retículo endoplasmático (SERCA, (Hughes, Lee and Tse, 2006)), el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ también tiene una participación del 20 - 30% de dicho proceso (Chen, Koh and Hille, 2003). Por lo tanto, como se mencionó anteriormente,

existe la posibilidad de que el influjo de sodio por este intercambiador, como parte del proceso para expulsar calcio, esté incrementado.

Finalmente, queda pendiente analizar cómo son los potenciales de acción generados por las células β durante las primeras etapas de desarrollo del síndrome metabólico. Ya que se han reportado cambios en los potenciales de acción, durante la secreción de insulina, de células β provenientes de animales alimentados con dietas altas en grasa (Gonzalez *et al.*, 2013).

Debido a que estos potenciales son generados por al menos 7 tipos de canales (Velasco *et al.*, 2016), queda pendiente analizar los posibles efectos de las primeras etapas del síndrome metabólico sobre otros canales iónicos y su relación con el aumento en la secreción de insulina.

CONCLUSIONES

- Durante el desarrollo temprano del síndrome metabólico, la hiperinsulinemia generada se asocia más con un aumento en la capacidad secretora en concentraciones basales y estimulantes de glucosa por parte de las células β que con un aumento en la masa de dichas células.
- Durante el desarrollo temprano del síndrome metabólico, las células β presentan un aumento en su tamaño celular, el cual se asocia con una mayor capacidad secretora.
- La ausencia de cambios en la activación, inactivación y densidad de corriente de sodio indican que, durante las primeras etapas del síndrome metabólico, este no tiene efectos sobre los canales de sodio sensibles a voltaje.
- Los canales de sodio sensibles a voltaje no contribuyen al aumento en la secreción de insulina observado durante las primeras etapas del síndrome metabólico.
- Durante el desarrollo temprano del síndrome metabólico hay un aumento en el influjo de iones Ca^{2+} hacia las células β a través de los canales sensibles a voltaje.

REFERENCIAS

Ackermann, A. M. and Gannon, M. (2007) 'Molecular regulation of pancreatic beta-cell mass development, maintenance, and expansion.', *Journal of molecular endocrinology*, 38(1–2), pp. 193–206. doi: 10.1677/JME-06-0053.

Ahern, C. A. *et al.* (2016) 'The hitchhiker's guide to the voltage-gated sodium channel galaxy.', *The Journal of general physiology*, 147(1), pp. 1–24. doi: 10.1085/jgp.201511492.

Alberti, K. G. M. M. *et al.* (2009) 'Harmonizing the Metabolic Syndrome', *Circulation*, 120(16), p. 1640 LP-1645. Available at: <http://circ.ahajournals.org/content/120/16/1640.abstract>.

Ayala, J. E. *et al.* (2006) 'Considerations in the Design of Hyperinsulinemic- Euglycemic Clamps in the Conscious Mouse', *Diabetes*, 55(October 2005), pp. 390–397. doi: 10.2337/diabetes.55.02.06.db05-0686.

Ayala, J. E. *et al.* (2010) 'Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice', *Disease Models & Mechanisms*, 3(9–10), pp. 525–534. doi: 10.1242/dmm.006239.

Aydin, S. *et al.* (2014) 'Today's and yesterday's of pathophysiology: Biochemistry of metabolic syndrome and animal models', *Nutrition*. Elsevier Inc., 30(1), pp. 1–9. doi: 10.1016/j.nut.2013.05.013.

Barnett, D. W., Pressel, D. M. and Mislis, S. (1995) 'Voltage-dependent Na⁺ and Ca²⁺ currents in human pancreatic islet β -cells: evidence for roles in the generation of action potentials and insulin secretion', *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 431(2), pp. 272–282. Available at: <http://www.springerlink.com/index/J155R83M7214TW73.pdf%5Cnpapers2://publication/uuid/4D280890-ED31-4E77-A5B9-B220C1D2F38B>.

Bernal-Mizrachi, E. and Wen, W. (2001) 'Islet β cell expression of constitutively active Akt1/PKB α induces striking hypertrophy, hyperplasia, and hyperinsulinemia', *Journal of Clinical ...*, 108(11), pp. 1575–1576. doi: 10.1172/JCI200113785.Introduction.

Black, J. A. and Waxman, S. G. (2013) 'Noncanonical roles of voltage-gated sodium channels', *Neuron*, pp. 280–291. doi: 10.1016/j.neuron.2013.09.012.

Boland, B., Rhodes, C. J. and Grimsby, J. S. (2017) 'The dynamic plasticity of insulin production in β -cells', *Molecular metabolism*, pp. 1–16.

Bowe, J. E. *et al.* (2014) 'Assessing glucose homeostasis in rodent models', *Journal of Endocrinology*, 222(3), pp. 13–25. doi: 10.1530/JOE-14-0182.

Braun, M. *et al.* (2008) 'Voltage-Gated Ion Channels in Human Pancreatic B-Cells: Electrophysiological Characterization and Role in Insulin Secretion', *Diabetes*, 57, pp. 1618–1628. doi: 10.2337/db07-0991.M.B.

Brereton, M. F. *et al.* (2015) 'Alpha-, Delta- and PP-cells: Are They the Architectural Cornerstones of Islet Structure and Co-ordination?', *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*, 63(8), pp. 575–91. doi: 10.1369/0022155415583535.

Bruce, K. D. and Byrne, C. D. (2009) 'The metabolic syndrome: common origins of a multifactorial disorder.', *Postgraduate medical journal*, 85(1009), pp. 614–21. doi: 10.1136/pgmj.2008.078014.

Butler, A. E. *et al.* (2003) 'Beta-cell deficit and increased beta-Cell apoptosis in humans with type 2 diabetes', *Diabetes*, 52(January), pp. 102–10. doi: 10.2337/diabetes.52.9.2304.

- Calhoun, J. D. and Isom, L. L. (2014) 'The role of non-pore-forming β subunits in physiology and pathophysiology of voltage-gated sodium channels.', in Ruben, P. C. (ed.) *Voltage gated sodium channels*, pp. 51–89.
- Cantrell, A. R. and Catterall, W. A. (2001) 'Neuromodulation of Na⁺ channels: An unexpected form of cellular plasticity', *Nature Reviews Neuroscience*, 2(6), pp. 397–407. doi: 10.1038/35077553.
- Catterall, W. a. (2012) 'Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology', *The Journal of Physiology*, 590(11), pp. 2577–2589. doi: 10.1113/jphysiol.2011.224204.
- Catterall, W. A. (2014) 'Structure and function of voltage-gated sodium channels at atomic resolution', *Exp. Physiol.*, 99(1), pp. 35–51.
- Catterall, W. A. and Swanson, T. M. (2015) 'Structural Basis for Pharmacology of Voltage-Gated Sodium and Calcium Channels', *Molecular pharmacology*, 88, pp. 141–150.
- Chadda, K. R. *et al.* (2017) 'Sodium channel biophysics, late sodium current and genetic arrhythmic syndromes', *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*. Pflügers Archiv - European Journal of Physiology, pp. 1–13. doi: 10.1007/s00424-017-1959-1.
- Chan, C. B. *et al.* (1999) ' β -Cell hypertrophy in fa/fa rats is associated with basal glucose hypersensitivity and reduced SNARE protein expression', *Diabetes*, 48(5), pp. 997–1005. doi: 10.2337/diabetes.48.5.997.
- Chan, C. B. *et al.* (2002) 'Glucose-inducible hypertrophy and suppression of anion efflux in rat beta cells', *Journal of Endocrinology*, 173(1), pp. 45–52. doi: 10.1677/joe.0.1730045.
- Chen, C. *et al.* (2016) 'Alterations in β -cell calcium dynamics and efficacy outweigh islet mass adaptation in compensation of insulin resistance and prediabetes onset', *Diabetes*, 65(9), pp. 2676–2685. doi: 10.2337/db15-1718.
- Chen, L., Koh, D. S. and Hille, B. (2003) 'Dynamics of calcium clearance in mouse pancreatic β -cells', *Diabetes*, 52(7), pp. 1723–1731. doi: 10.2337/diabetes.52.7.1723.
- Colsool, B., Vennekens, R. and Nilius, B. (2011) 'Transient Receptor Potential Cation Channels in Pancreatic B cells', *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol*, 161, pp. 87–110. doi: 10.1007/112.
- Diaz-Garcia, C. M., Sanchez-Soto, C. and Hiriart, M. (2010) 'Toxins that modulate ionic channels as tools for exploring insulin secretion', *Cellular and Molecular Neurobiology*, 30(8), pp. 1275–1281. doi: 10.1007/s10571-010-9586-9.
- Ding, W. G. and Kitasato, H. (1997) 'Suppressing Na⁺ influx induces an increase in intracellular ATP concentration in mouse pancreatic B-cells', *Japanese Journal of Physiology*, 47, pp. 299–306.
- Donath, M. Y. and Shoelson, S. E. (2011) 'Type 2 diabetes as an inflammatory disease', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 11(2), pp. 98–107. doi: 10.1038/nri2925.
- Donatsch, P. *et al.* (1977) 'The functional significance of sodium channels in pancreatic beta-cell membranes.', *The Journal of physiology*, 267(2), pp. 357–76. doi: 10.1113/jphysiol.1977.sp011817.
- Eckel, R. H., Grundy, S. M. and Zimmet, P. Z. (2005) 'The metabolic syndrome', *Lancet*, 365(9468), pp. 1415–1428. doi: 10.1016/S0140-6736(05)66378-7.
- Ellenbroek, J. H. *et al.* (2013) 'Topologically Heterogeneous Beta Cell Adaptation in Response to High-Fat Diet in Mice', *PLoS ONE*, 8(2). doi: 10.1371/journal.pone.0056922.
- Erdmann, J. *et al.* (2009) 'Weight-dependent differential contribution of insulin secretion and

clearance to hyperinsulinemia of obesity', *Regulatory Peptides*. Elsevier B.V., 152(1–3), pp. 1–7. doi: 10.1016/j.regpep.2008.10.008.

Ernst, S. J., Aguilar-Bryan, L. and Noebels, J. L. (2009) 'Sodium channel beta1 regulatory subunit deficiency reduces pancreatic islet glucose-stimulated insulin and glucagon secretion.', *Endocrinology*, 150(March), pp. 1132–1139. doi: 10.1210/en.2008-0991.

Fex, M. *et al.* (2007) 'Enhanced mitochondrial metabolism may account for the adaptation to insulin resistance in islets from C57BL/6J mice fed a high-fat diet', *Diabetologia*, 50(1), pp. 74–83. doi: 10.1007/s00125-006-0464-4.

Finegood, D. T. *et al.* (2001) ' β -Cell mass dynamics in Zucker diabetic fatty rats: Rosiglitazone prevents the rise in net cell death', *Diabetes*, 50(5), pp. 1021–1029. doi: 10.2337/diabetes.50.5.1021.

Gallagher, E. J., LeRoith, D. and Karnieli, E. (2010) 'Insulin resistance in obesity as the underlying cause for the metabolic syndrome', *The Mount Sinai journal of medicine*, 77(2), pp. 511–523. doi: 10.1002/MSJ.

Gilchrist, J., Olivera, B. M. and Bosmans, F. (2014) 'Animal Toxins Influence Voltage-Gated Sodium Channel Function', in Ruben, P. C. (ed.) *Voltage gated sodium channels*, pp. 203–229. doi: 10.1007/978-3-642-41588-3.

Gilon, P. and Rorsman, P. (2009) 'NALCN: a regulated leak channel.', *EMBO reports*, 10(9), pp. 963–4. doi: 10.1038/embor.2009.185.

Giordano, E. *et al.* (1993) 'B-cell size influences glucose-stimulated insulin secretion.', *The American journal of physiology*, 265(2 Pt 1), pp. C358–C364.

Gonçalves, A. A. *et al.* (2003) 'Participation of Na⁺ channels in the potentiation by Tityus serrulatus α -toxin TsTx-V of glucose-induced electrical activity and insulin secretion in rodent islet β -cells', *Toxicon*, 41(8), pp. 1039–1045. doi: 10.1016/S0041-0101(03)00086-2.

Gonzalez, A. *et al.* (2013) 'Insulin hypersecretion in islets from diet-induced hyperinsulinemic obese female mice is associated with several functional adaptations in individual β -cells', *Endocrinology*, 154(10), pp. 3515–3524. doi: 10.1210/en.2013-1424.

Hamill, O. P. *et al.* (1981) 'Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches', *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 391(2), pp. 85–100. doi: 10.1007/BF00656997.

Henquin, J.-C. *et al.* (2015) 'Dynamics of glucose-induced insulin secretion in normal human islets', *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*, 309(7), pp. E640–E650. doi: 10.1152/ajpendo.00251.2015.

Hiriart, M., Velasco, M., Larqué, C., *et al.* (2014) 'Metabolic syndrome and ionic channels in pancreatic beta cells', *Vitamins and Hormones*, 95, pp. 87–114. doi: 10.1016/B978-0-12-800174-5.00004-1.

Hiriart, M., Velasco, M., Diaz-Garcia, C. M., *et al.* (2014) 'Pancreatic Beta Cells in Metabolic Syndrome', in Islam, M. S. (ed.) *Islets of Langerhans*, pp. 817–844. doi: 10.1007/978-94-007-6884-0.

Hiriart, M. and Aguilar-Bryan, L. (2008a) 'Channel regulation of glucose sensing in the pancreatic B-cell', *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 295(Vdcc), pp. 1298–1306. doi: 10.1152/ajpendo.90493.2008.

Hiriart, M. and Aguilar-Bryan, L. (2008b) 'Channel regulation of glucose sensing in the pancreatic β -cell', *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 295(6), pp. E1298–E1306. Available at: <http://ajpendo.physiology.org/content/295/6/E1298.abstract>.

- Hiriart, M. and Matteson, D. R. (1988) 'Na channels and two types of Ca channels in rat pancreatic B cells identified with the reverse hemolytic plaque assay.', *The Journal of general physiology*, 91(5), pp. 617–639. doi: 10.1085/jgp.91.5.617.
- Hiriart, M. and Ramirez-Medeles, M. C. (1991) 'Functional subpopulations of individual pancreatic b-cells in culture', *Endocrinology*, 128(6), pp. 3193–3198. doi: 10.1210/endo-128-6-3193.
- Hiriart, M. and Ramirez-Medeles, M. C. (1993) 'Muscarinic modulation of insulin secretion by single pancreatic β -cells', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 93(1), pp. 63–69. doi: 10.1016/0303-7207(93)90140-F.
- Hou, J. C., Min, L. and Pessin, J. E. (2009) *Insulin granule biogenesis, trafficking and exocytosis*. 1st edn, *Vitamins and hormones*. 1st edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/S0083-6729(08)00616-X.
- Huang, L. *et al.* (2004) '[Ca²⁺]_i regulates trafficking of Cav1.3 (a1D Ca²⁺ channel) in insulin-secreting cells', *Am J Physiol Cell Physiol*, 286, pp. 213–221.
- Hughes, E., Lee, A. K. and Tse, A. (2006) 'Dominant Role of Sarcoendoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase Pump in Ca²⁺ Homeostasis and Exocytosis in Rat Pancreatic β -Cells', *Endocrinology*, 147(3), pp. 1396–1407. doi: 10.1210/en.2005-1023.
- Jonas, J. *et al.* (1999) 'Chronic hyperglycemia triggers loss of pancreatic beta cell differentiation in an animal model of diabetes.', *Journal of Biological Chemistry*, 274(20), pp. 14112–14121. doi: 10.1074/jbc.274.20.14112.
- Jouvet, N. and Estall, J. L. (2017) 'The pancreas: Bandmaster of glucose homeostasis', *Experimental Cell Research*, (January). doi: 10.1016/j.yexcr.2017.03.050.
- Kalwat, M. A. and Cobb, M. H. (2017) 'Mechanisms of the amplifying pathway of insulin secretion in the β cell', *Pharmacology & therapeutics*, XXX(1–14).
- Kato, S. *et al.* (1996) 'Alterations in basal and glucose-stimulated voltage-dependent Ca²⁺ channel activities in pancreatic β cells of non-insulin-dependent diabetes mellitus GK rats', *Journal of Clinical Investigation*, 97(11), pp. 2417–2425. doi: 10.1172/JCI118688.
- Keane, K. and Newsholme, P. (2014) *Metabolic regulation of insulin secretion*. 1st edn, *Vitamins and Hormones*. 1st edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-800174-5.00001-6.
- Kooptiwut, S. *et al.* (2002) 'Comparison of insulin secretory function in two mouse models with different susceptibility to beta-cell failure.', *Endocrinology*, 143(6), pp. 2085–92. doi: 10.1210/endo.143.6.8859.
- Kozma, S. C. and Thomas, G. (2002) 'Regulation of cell size in growth, development and human disease: PI3K, PKB and S6K', *BioEssays*, 24(1), pp. 65–71. doi: 10.1002/bies.10031.
- Kraegen, E. W. *et al.* (2010) 'Development of Muscle Insulin Resistance', *Diabetes*, 40(11), pp. 1397–1403.
- Kruger, L. C. and Isom, L. L. (2016) 'Voltage-gated na⁺ channels: Not just for conduction', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 8, pp. 1–18.
- Kwong, K. and Carr, M. J. (2015) 'Voltage-gated sodium channels', *Current opinion in Pharmacology*, 22, pp. 131–139.
- Larqué, C., Velasco, M., Navarro-Tableros, V., *et al.* (2011) 'Early endocrine and molecular changes in metabolic syndrome models', *IUBMB Life*, 63(10), pp. 831–839. doi: 10.1002/iub.544.
- Larqué, C., Velasco, M., Navarro-Tableros, V., *et al.* (2011) 'Early Endocrine and Molecular Changes

in Metabolic Syndrome Models', *IUBMB Life*, 63(10), pp. 831–839.

Marie, J. C. *et al.* (2001) 'Defective glucose-dependent cytosolic Ca²⁺ handling in islets of GK and nSTZ rat models of type 2 diabetes', *Journal of Endocrinology*, 169(1), pp. 169–176. doi: 10.1677/joe.0.1690169.

Marini, M. A. *et al.* (2014) 'Differences in insulin clearance between metabolically healthy and unhealthy obese subjects', *Acta Diabetologica*, 51(2), pp. 257–261. doi: 10.1007/s00592-013-0511-9.

Mattei, C. and Legros, C. (2014) 'The voltage-gated sodium channel: A major target of marine neurotoxins', *Toxicon*, 91, pp. 84–95.

McCulloch, L. J. *et al.* (2017) 'GLUT2 (*SLC2A2*) is not the principal glucose transporter in human pancreatic beta cells: Implications for understanding genetic association signals at this locus', *Molecular Genetics and Metabolism*. Elsevier, 104(4), pp. 648–653. doi: 10.1016/j.yimgme.2011.08.026.

Minami, K. *et al.* (2002) 'Normalization of intracellular Ca²⁺ induces a glucose-responsive state in glucose-unresponsive β -cells', *Journal of Biological Chemistry*, 277(28), pp. 25277–25282. doi: 10.1074/jbc.M203988200.

Miranda, P. J. *et al.* (2005) 'Metabolic syndrome: Definition, pathophysiology, and mechanisms', *American Heart Journal*, 149(1), pp. 33–45. doi: 10.1016/j.ahj.2004.07.013.

Mittelman, S. D. *et al.* (2000) 'Longitudinal compensation for fat-induced insulin enhanced beta-cell response', *Diabetes*, 49(December), pp. 2116–2125. doi: 10.2337/diabetes.49.12.2116.

Murphy, E. and Eisner, D. A. (2009) 'Regulation of intracellular and mitochondrial sodium in health and disease.', *Circulation Research*.

Murtaugh, L. C. and Melton, D. a (2003) 'Genes, signals, and lineages in pancreas development.', *Annual review of cell and developmental biology*, 19, pp. 71–89. doi: 10.1146/annurev.cellbio.19.111301.144752.

Namadurai, S. *et al.* (2015) 'A new look at sodium channel β subunits.', *Open biology*, 5(1), p. 140192. doi: 10.1098/rsob.140192.

Navarro-Tableros, V. *et al.* (2006) 'Physiological development of insulin secretion, calcium channels, and GLUT2 expression of pancreatic rat beta-cells', *AJP: Endocrinology and Metabolism*, 292(4), pp. E1018–E1029. doi: 10.1152/ajpendo.00457.2006.

Newsholme, P. *et al.* (2014) 'Nutrient regulation of insulin secretion and action', *Journal of Endocrinology*. doi: 10.1530/JOE-13-0616.

Ning, Y. *et al.* (2011) 'Ranolazine Increases B-Cell Survival and Improves Glucose Homeostasis in Low-Dose Streptozotocin-Induced Diabetes in Mice', *the Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 337(1), pp. 50–58. doi: 10.1124/jpet.110.176396.tients.

Nita II *et al.* (2014) 'Pancreatic b-cell Na⁺ channels control global Ca²⁺ signaling and oxidative metabolism by inducing Na⁺ and Ca²⁺ responses that are propagated into mitochondria', *Faseb J*, 28(8), pp. 3301–3312. doi: 10.1096/fj.13-248161.

Nita, I. I. *et al.* (2012) 'The Mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ Exchanger Upregulates Glucose Dependent Ca²⁺ Signalling Linked to Insulin Secretion', *PLoS ONE*, 7(10). doi: 10.1371/journal.pone.0046649.

Nita, I. I. *et al.* (2015) 'A crosstalk between Na⁺ channels, Na⁺/K⁺ pump and mitochondrial Na⁺ transporters controls glucose-dependent cytosolic and mitochondrial Na⁺ signals', *Cell Calcium*.

Elsevier Ltd, 57(2), pp. 69–75. doi: 10.1016/j.ceca.2014.12.007.

Nolan, C. J. *et al.* (2006) 'Beta cell compensation for insulin resistance in Zucker fatty rats: Increased lipolysis and fatty acid signalling', *Diabetologia*, 49(9), pp. 2120–2130. doi: 10.1007/s00125-006-0305-5.

Noriega-López, L. *et al.* (2007) 'Pancreatic insulin secretion in rats fed a soy protein high fat diet depends on the interaction between the amino acid pattern and isoflavones', *Journal of Biological Chemistry*, 282(28), pp. 20657–20666. doi: 10.1074/jbc.M701045200.

Ohta, M. *et al.* (1993) 'Effect of Ca⁺⁺ channel blockers on energy level and stimulated insulin secretion in isolated rat islets of Langerhans.', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 264(1), p. 35 LP-40. Available at: <http://jpet.aspetjournals.org/content/264/1/35.abstract>.

Olofsson, C. S. *et al.* (2002) 'Fast insulin secretion reflects exocytosis of docked granules in mouse pancreatic B-cells', *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 444(1–2), pp. 43–51. doi: 10.1007/s00424-002-0781-5.

Pagliassotti, M. J. and Prach, P. A. (1995) 'Quantity of sucrose alters the tissue pattern and time course of insulin resistance in young rats.', *The American journal of physiology*, 269, pp. R641–R646.

Panchal, S. K. and Brown, L. (2011) 'Rodent models for metabolic syndrome research.', *Journal of Biomedicine and Biotechnology*.

Paris, M. *et al.* (2003) 'Specific and combined effects of insulin and glucose on functional pancreatic beta-cell mass in vivo in adult rats.', *Endocrinology*, 144(6), pp. 2717–27. doi: 10.1210/en.2002-221112.

Persaud, S. J. *et al.* (1999) 'Tyrosine kinases play a permissive role in glucose-induced insulin secretion from adult rat islets', *Journal of Molecular Endocrinology*, 22(1), pp. 19–28. doi: 10.1677/jme.0.0220019.

Piro, S. *et al.* (2016) 'The Endocrine Pancreas', in Belfiore, A. and LeRoith, D. (eds) *Principles of Endocrinology and Hormone Action*. Springer International Publishing, pp. 1–32.

Plant, T. D. (1988) 'Na⁺ currents in cultured mouse pancreatic B-cells', *Pflugers Archiv*, 411, pp. 429–435.

Poitout, V. *et al.* (2010) 'Glucolipotoxicity of the pancreatic beta cell', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. Elsevier B.V., 1801(3), pp. 289–298. doi: 10.1016/j.bbalip.2009.08.006.

Pressel, D. M. and Mislser, S. (1990) 'Sodium channels contribute to action potential generation in canine and human pancreatic islet B cells', *The Journal of Membrane Biology*, 116(3), pp. 273–280. doi: 10.1007/BF01868466.

Proks, P. and Clark, R. (2015) 'ATP-Sensitive Potassium Channels in Health and Disease', in.

Rask-Madsen, C. and Kahn, C. R. (2012) 'Tissue-specific insulin signaling, metabolic syndrome, and cardiovascular disease', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(9), pp. 2052–2059. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.241919.

Regazzi, R., Rodriguez-Trejo, A. and Jacovetti, C. (2016) 'Insulin secretion in health and disease: nutrients dictate the pace', *Proceedings of the Nutrition Society*, 75(01), pp. 19–29. doi: 10.1017/S0029665115004152.

Rizzetto, R. *et al.* (2015) 'Late sodium current (INaL) in pancreatic β -cells', *Pflugers Archiv European*

Journal of Physiology, 467(8), pp. 1757–1768. doi: 10.1007/s00424-014-1613-0.

Roder, P. V. *et al.* (2016) 'Molecular regulation of insulin granule biogenesis and exocytosis', *Biochemical Journal*, 473(18), pp. 2737–2756. doi: 10.1042/BCJ20160291.

Roe, M. W. *et al.* (1996) 'NIDDM is associated with loss of pancreatic B-cell L-type Ca²⁺ channel activity', *American Journal of Physiology*, 270(33), pp. E133–E140.

Rorsman, P., Arkhammar, P. and O Berggren, P. (1987) *Voltage-activated Na⁺ currents and their suppression by phorbol ester in clonal insulin-producing RINm5F cells*, *The American journal of physiology*.

Rosenbaum, T. *et al.* (1996) 'Membrane Biology Nerve Growth Factor Increases Sodium Current in Pancreatic β Cells', *New York*, 58(85), pp. 53–58.

Ruvinsky, I. *et al.* (2005) 'Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis', *Genes and Development*, 19(18), pp. 2199–2211. doi: 10.1101/gad.351605.

Singh, H. *et al.* (2014) 'Islet adaptation to obesity and insulin resistance in WNIN/GR-Ob rats.', *Islets*, 6(5–6), p. e998099. doi: 10.1080/19382014.2014.998099.

Steiner, D. *et al.* (2010) 'Pancreatic islet plasticity: interspecies comparison of islet architecture and composition', *Islets*, 2:3(June), pp. 135–145. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2908252/> (Accessed: 19 August 2014).

Steiner, D. F. (2011) 'Adventures with insulin in the islets of Langerhans.', *The Journal of biological chemistry*, 286(20), pp. 17399–17421. doi: 10.1074/jbc.X111.244764.

Stewart, L. K. *et al.* (2009) 'Failure of dietary quercetin to alter the temporal progression of insulin resistance among tissues of C57BL/6J mice during the development of diet-induced obesity', *Diabetologia*, 52(3), pp. 514–523. doi: 10.1007/s00125-008-1252-0.

Szabat, M. *et al.* (2015) 'High-content screening identifies a role for Na⁺ channels in insulin production', *Royal Society Open Science*, 2.

Thaman R and Arora GP (2013) 'Metabolic Syndrome: Definition and Pathophysiology– the discussion goes on! Metabolic Syndrome: Definition and Pathophysiology– the discussion goes on! Introduction and Definition', *J Phys Pharm Adv Journal of Physiology and Pharmacology Advances THAMAN AND ARORA J. Phys. Pharm. Adv. J. Phys. Pharm. Adv*, 3(33), pp. 48–5648. doi: 10.5455/jppa.20130317071355.

Velasco, M. *et al.* (2012a) 'Metabolic syndrome induces changes in KATP-channels and calcium currents in pancreatic β -cells', *Islets*, 4(4), pp. 302–311. doi: 10.4161/isl.21374.

Velasco, M. *et al.* (2012b) 'Metabolic syndrome induces changes in KATP-channels and calcium currents in pancreatic β -cells', *Islets*, 4(4), pp. 302–311. doi: 10.4161/isl.21374.

Velasco, M. *et al.* (2016) 'Modulation of ionic channels and insulin secretion by drugs and hormones in pancreatic beta cells.', *Molecular pharmacology*, (September), pp. 341–357. doi: 10.1124/mol.116.103861.

Vignali, S. *et al.* (2006) 'Characterization of voltage-dependent sodium and calcium channels in mouse pancreatic A- and B-cells.', *The Journal of physiology*, 572(Pt 3), pp. 691–706. doi: 10.1113/jphysiol.2005.102368.

Vijayaragavan, K., Boutjdir, M. and Chahine, M. (2004) 'Modulation of Nav1.7 and Nav1.8 peripheral nerve sodium channels by protein kinase A and protein kinase C', *J Neurophysiol*, 91, pp. 1556–1569. doi: 10.1152/jn.00676.2003.

- Vinué, Á. and González-navarro, H. (2015) 'Methods in Mouse Atherosclerosis', 1339, pp. 247–254. doi: 10.1007/978-1-4939-2929-0.
- Wang, Z. and Thurmond, D. C. (2009) 'Mechanisms of biphasic insulin-granule exocytosis - roles of the cytoskeleton, small GTPases and SNARE proteins.', *Journal of cell science*. doi: 10.1242/jcs.034355.
- Ward, C. W. and Lawrence, M. C. (2011) 'Landmarks in insulin research', *Frontiers in Endocrinology*, 2(NOV), pp. 1–11. doi: 10.3389/fendo.2011.00076.
- Watanabe, E. *et al.* (2000) 'Nav2/NaG channel is involved in control of salt-intake behavior in the CNS.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(20), pp. 7743–7751. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1774-00.2000 [pii].
- Weir, G. C. and Bonner-Weir, S. (2004) 'Five of stages of evolving B-cell dysfunction during progression to diabetes', *Diabetes*, 53(SUPPL. 3). doi: 10.2337/diabetes.53.suppl_3.S16.
- Wong, S. K. *et al.* (2016) 'Animal models of metabolic syndrome: a review', *Nutrition & Metabolism*. *Nutrition & Metabolism*, 13(1), p. 65. doi: 10.1186/s12986-016-0123-9.
- Yang *et al.* (2014) 'Ionic mechanisms in pancreatic β cell signaling', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(21), pp. 4149–4177. doi: 10.1007/s00018-014-1680-6.
- Yang, S.-N. *et al.* (2014) 'Ionic mechanisms in pancreatic β cell signaling', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(21), pp. 4149–4177. doi: 10.1007/s00018-014-1680-6.
- Yang, Y. H. C. *et al.* (2014) 'Multiparameter Screening Reveals a Role for Na⁺ Channels in Cytokine-Induced β -Cell Death', *Molecular Endocrinology*, 28(3), pp. 406–417. doi: 10.1210/me.2013-1257.
- Zakon, H. H. (2012) 'Adaptive evolution of voltage-gated sodium channels: the first 800 million years.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, pp. 10619–10625.
- Zhang, Q. *et al.* (2014) 'Na⁺ current properties in islet α - and β -cells reflect cell-specific Scn3a and Scn9a expression.', *The Journal of physiology*, 592(Pt 21), pp. 4677–96. doi: 10.1113/jphysiol.2014.274209.
- Zou, N. *et al.* (2013) 'ATP regulates sodium channel kinetics in pancreatic islet beta cells.', *The Journal of membrane biology*, 246(2), pp. 101–7. doi: 10.1007/s00232-012-9506-7.