

UNIVERSIDAD DE SONORA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

**Análisis Amperométrico De La Oxidación De Insulina Y
Caracterización Electrofisiológica De Las Corrientes De Calcio Que
Promueven La Liberación De La Hormona En Células Beta
Pancreáticas**

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el Título de

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

Silvia Anahi Valdés Rives

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



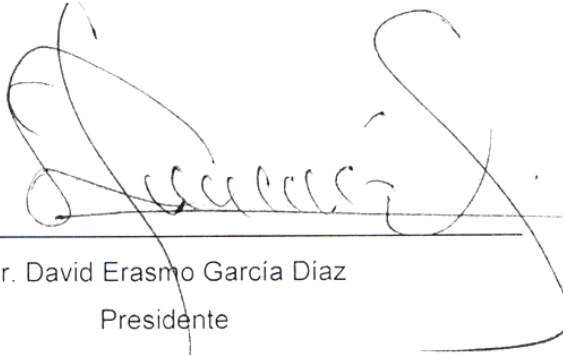
Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la UNAM, bajo la dirección del Dr. David Erasmo García Díaz. Gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) (Clave del proyecto IN215813). Agradezco a la DGAPA-PAPIIT-UNAM la beca recibida.

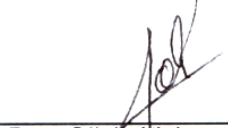
VOTOS APROBATORIOS

Los miembros del jurado calificador del examen profesional de hemos revisado detenidamente su trabajo escrito titulado “análisis amperométrico de la oxidación de insulina y caracterización electrofisiológica de las corrientes de calcio que promueven la liberación de la hormona en células beta pancreáticas” y encontramos que cumple con los requisitos para la presentación de su examen profesional. Por tal motivo recomendamos se acepte dicho trabajo como requisito parcial para la obtención de título de Silvia Anahi Valdés Rives.


Atentamente:



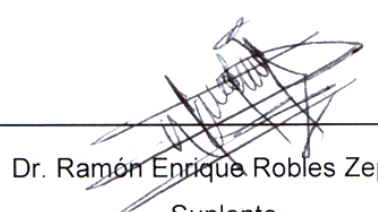
Dr. David Erasmo Garcia Díaz
Presidente



Dra. Olivia Valenzuela Antelo
Secretario



Dr. Enrique Bolado Martínez
Vocal



Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda
Suplente

DEDICATORIA

A mis padres, Silvia Rives y Víctor Valdés, y a mis hermanos Víctor Manuel y María José, por apoyarme en este proyecto que culmina un gran paso en mi vida a pesar de que esto me mantuviera lejos de ellos por más de un año.

A mis tíos, Angélica Rives y Alejandro García, y a mis primas, Paola y Alejandra, por apoyarme y ser mi familia lejos de casa durante todo esta etapa. Así como a mi familia Rives, tías, tíos, primas y primos, por alentarme y por su apoyo incondicional.

A mi futuro esposo, Sergio Zamora, por su apoyo incondicional durante este proyecto, por acompañarme en las buenas y por su paciencia, comprensión y consejos en las malas.

A mis tutores, David García y Olivia Valenzuela, por darme la oportunidad de realizar este trabajo en una institución que admiro y respeto como lo es la Universidad Nacional Autónoma de México.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermanos, por apoyarme en este largo camino que ha sido tanto los estudios como la tesis de licenciatura y siempre alentarme a buscar y alcanzar mis metas aunque me lleve lejos de casa. También a mis tíos y primas, por darme una casa a lo largo de este proyecto y al resto de mi familia.

A mi novio y futuro esposo, Sergio Zamora, por siempre estar ahí para animarme y motivarme. Así como a la familia Zamora Erazo por su apoyo y sus buenos deseos.

A mis tutores, Dr. David García y Dra. Olivia Valenzuela, por apoyarme a realizar este trabajo, así como a mis sinodales Dr. Enrique Bolado y Dr. Ramón Robles por la revisión y apoyo de este trabajo de tesis.

A Lizbeth de la Cruz por su apoyo y ayuda en el desarrollo de este trabajo de tesis, por sus enseñanzas y las buenas pláticas que me ayudaron a mejorar en lo profesional y lo personal. Sin ella, este trabajo no hubiera sido lo mismo.

A la Biol. Isabel Arenas por su apoyo técnico.

A todo el maravilloso equipo de trabajo del laboratorio del Dr. David García: Jorge Bravo, Julieta Garduño, Héctor Castro, Arturo Reyes, Erika Puente, Celeste Sanchez, Cinthya García, Karina Bermeo, Adrián López y al Señor Luis, por su compañía, amistad, apoyo, ánimo y valiosos consejos durante todo este proyecto, ha sido una gran experiencia gracias a todos ustedes. También al Dr. David Elías y al Ing. Estaban Ruíz, por su apoyo en este proyecto de tesis con la elaboración de varios equipos.

A todos mis maestros de la licenciatura que me ayudaron a desarrollarme profesionalmente, especialmente a la Dra. Adriana Garibay por incentivar mi gusto por la investigación, además de su increíble apoyo siendo o no su alumna y a la M.C. Lupita Cañez por su apoyo durante toda la carrera como mi tutora y consejera.

A mis amigos de la licenciatura por hacer de esta experiencia única, por su apoyo, entusiasmo, y las buenas pláticas y risas que vivimos a lo largo de estos años: Pancho, Joaquín, Ashley y Alan. A mis grandes amigos, Juan y Josué, por su constante apoyo.

A mis amigas de toda la vida, que siempre han estado ahí para apoyarme y que las quiero como hermanas: Zinia, Lupita, Mayra, Alejandra, Ana Lucía, Yuzze, Patricia, Aura.

Y a todos, los que han estado involucrados directa o indirectamente en este trabajo y que sin querer olvide mencionar. A todos, muchísimas gracias.

CONTENIDO

	Página
Aprobación.....	3
Dedicatoria.....	4
Agradecimientos.....	5
Contenido.....	6
Lista de figuras.....	8
Abreviaturas.....	9
Objetivos.....	10
Generales.....	10
Particulares.....	10
Resumen.....	11
Introducción.....	12
Antecedentes.....	13
Páncreas.....	13
Insulina.....	16
Liberación y regulación de insulina.....	16
Células beta.....	19
Voltametría y amperometría.....	21
Electrodos.....	24
Electrodos de fibra de carbono.....	24
Modificaciones.....	25
Compuestos de rutenio.....	26
Materiales y Métodos.....	28
Voltametría.....	28
Modificación de electrodos con cloruro de rutenio.....	29
Registro amperométrico hidrodinámico de insulina.....	30
Preparación de cultivo de células beta pancreáticas.....	30
Registros electrofisiológicos en células beta pancreáticas.....	31
Resultados y Discusión.....	34
Voltametría.....	34
Modificación de electrodos con cloruro de rutenio.....	37
Registro amperométrico hidrodinámico de insulina.....	39

Identificación de células beta en cultivo primario de páncreas.....	40
Corrientes de calcio en células beta pancreáticas.....	42
Farmacología de las corrientes de calcio.....	47
Conclusiones.....	50
Perspectivas.....	51
Bibliografía.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Posición anatómica del páncreas.....	14
2.	Células acinares del páncreas.....	14
3.	Islotes de Langerhans.....	15
4.	Liberación de insulina.....	17
5.	Relación entre las corrientes de calcio, el calcio libre intracelular y capacitancia de membrana.....	20
6.	Voltametría cíclica de noradrenalina.....	22
7.	Registro amperométrico de la liberación de un gránulo de noradrenalina.....	23
8.	Características de la superficie de una fibra de carbono.....	25
9.	Puentes de disulfuro de la insulina.....	26
10.	Reacción de grupos tiol con compuestos de rutenio.....	27
11.	Elaboración de electrodos de fibra de carbono.....	28
12.	Esquema de Patch-Clamp en configuración de célula completa.....	32
13.	Voltametría de serotonina.....	35
14.	Modificación de electrodos con cloruro de rutenio.....	38
15.	Registro amperométrica de una espiga representativa de insulina.....	40
16.	Clasificación de células beta pancreáticas por capacitancia en cultivo.....	41
17.	Análisis de las corrientes de calcio en las células beta pancreáticas.....	45
18.	Capacitancia de las poblaciones celulares presentes en el cultivo.....	46
19.	Efecto de la nifedipina y el cadmio sobre las corrientes de calcio.....	48

ABREVIATURAS

Transportador de glucosa 2.....	GLUT-2
Técnica de fijación en microáreas de membrana.....	Patch-Clamp
Línea celular derivada de insulinoma de rata.....	INS-1
Línea celular derivada de insulinoma de ratón.....	β -TC
Picofaradio.....	pF
Canales de calcio sensibles a voltaje (<i>Inglés</i> : Voltage-dependent calcium channels).....	VDCC
Receptor de Insulina.....	IR
Fosfatidilinositol-3 cinasa.....	PIK3
Cinasas activadas por mitógenos.....	MAP cinasas
Diabetes Mellitus Tipo 2.....	DM2
Femtofaradios.....	fF
Canales de bajo umbral (<i>Inglés</i> : Low voltage activated channel).....	LVA
Canales de alto umbral (<i>Inglés</i> : High voltage activated channel).....	HVA
Dihidropiridinas.....	1, 4-DPH
Megaohms.....	M Ω
Corriente máxima.....	I _{max}
Péptido insulínico-dependiente de glucosa.....	GIP
Péptido similar al glucagón tipo 1.....	GLP-1

OBJETIVOS

Objetivos Generales

Medir por amperometría hidrodinámica la oxidación de insulina y caracterizar las propiedades electrofisiológicas de las corrientes de calcio en células beta pancreáticas de rata.

Objetivos Particulares

- Determinar por amperometría hidrodinámica la oxidación de insulina mediante electrodos de fibra de carbono modificados con cloruro de rutenio.
- Identificar a las células beta pancreáticas en cultivo celular primario de rata.
- Analizar las corrientes de calcio que fluyen a través de canales HVA en células beta pancreáticas.

RESUMEN

El estudio de la liberación de insulina es relevante porque las acciones de esta hormona subyacen a la homeostasis de la glucemia. Es la única hormona hipoglucemiante y sus efectos en el metabolismo de los carbohidratos están ampliamente documentados. Asimismo, regula de manera eficiente el metabolismo de lípidos y proteínas en los períodos de ayuno y postprandiales. Después de varias décadas de estudio, aún no se conocen en detalle los mecanismos de liberación de la insulina, los cuales son fundamentales para entender la etiología y patogenia de varias enfermedades relacionadas. Por lo anterior, es crucial conocer el proceso de liberación de insulina en condiciones fisiológicas a fin de elaborar las estrategias preventivas adecuadas para las patologías relacionadas a dicho evento. El propósito de este trabajo de tesis fue implementar una técnica electroquímica para la medición de la oxidación de la insulina, que permita el estudio detallado de la liberación de ésta. Asimismo fue necesaria la implementación del cultivo primario de células beta pancreáticas de rata, para estudiar la liberación de insulina en célula única.

La implementación de la técnica amperométrica fue exitosa, ya que se logró registrar la oxidación de la insulina mediante electrodos modificados. Asimismo se logró obtener cultivos primarios viables de células beta pancreáticas. En dichos cultivos, se identificó a las células mediante la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana (Patch-Clamp) y se obtuvieron así algunos parámetros de su caracterización electrofisiológica. La capacitancia de la membrana fue de 6 a 12 pF y la amplitud de las corrientes de calcio registradas fue variable, razón por la que se clasificaron en tres distintos grupos. La amplitud de la corriente de calcio para el grupo 1 es de ~30 pA, el grupo 2 de ~70 pA, mientras que ~140 pA se registraron en el grupo 3. Mediante el uso de herramientas farmacológicas, se determinó que el grupo 2 y 3 expresan una corriente de calcio predominantemente debida a canales de alto umbral (HVA, high voltage activation channel, por sus siglas en inglés) de tipo L. Estos resultados son consistentes con la viabilidad del registro amperométrico de insulina en células beta pancreáticas y la identificación de tipos celulares que difieren en la naturaleza de sus corrientes.

INTRODUCCIÓN

La secreción de neurotransmisores y hormonas es un proceso complejo que es central para diversas funciones biológicas. Uno de los sistemas de mayor relevancia es la secreción de insulina de las células beta pancreáticas, debido a las acciones biológicas que la insulina ejerce en la regulación de la glucemia; así como en el metabolismo de lípidos y proteínas durante los períodos de ayuno y postprandiales (Boron y Boulpaep, 2009a; Olivares y Arellano, 2008).

El estudio de la cinética de liberación de moléculas es relevante desde el punto de vista mecanístico. Se han estudiado diversos tipos de células secretoras, sin embargo existen pocos trabajos en células beta pancreáticas, las cuales son el único tipo celular que liberan insulina, y aún se desconocen los detalles finos su liberación (Hiriart y Matteson, 1988; Satin y Cook, 1985). Elucidar el mecanismo celular por el cual se regula la liberación de insulina es de gran interés debido a las consecuencias que un déficit en su liberación provoca, como lo son desórdenes en la glucemia que conllevan al desarrollo de enfermedades metabólicas como la Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2). Para dichos estudios se utilizan técnicas electroquímicas, como la amperometría con electrodos modificados que promuevan la oxidación de insulina. Ésta técnica permite analizar los componentes involucrados en el mecanismo de liberación en tiempo real (Kennedy y col, 1993; Mears, 2004; Sakmann y Neher, 2009).

Un componente importante en el mecanismo de liberación de esta hormona hipoglucemiante, es la entrada de calcio a la célula a través de canales de calcio sensibles a voltaje (VDCC), para la fusión de las vesículas de insulina (Ammälä y col., 1993; Satin y Cook, 1988). Los VDCC se clasifican en canales de bajo umbral (LVA) y canales de alto umbral (HVA). Los canales HVA tipo L proveen la mayor entrada de calcio a la célula beta para la liberación de insulina (Hiriart y Aguilar-Bryan, 2008; Taylor y col., 2005).

Por lo tanto, la relevancia de este estudio radica en aportar una herramienta ventajosa en la comprensión de estos mecanismos de liberación y, asimismo, de la población de canales de calcio sensibles a voltaje que participan en la liberación de esta hormona.

ANTECEDENTES

Tras décadas de estudio se sabe que la liberación de insulina se favorece por el incremento de la glucemia. El cambio en la concentración plasmática de glucosa basal suscita una señalización en la célula beta que finaliza con la apertura de VDCC. Esto promueve la entrada de calcio a la célula y conlleva a la fusión de las vesículas de insulina en la membrana celular. Los estudios dirigidos a elucidar los mecanismos de liberación se realizan en células únicas, las cuales provienen de un cultivo primario o bien de una línea celular. Las técnicas mayormente utilizadas para el estudio de la célula beta son: Patch-Clamp para la caracterización electrofisiológica, y técnicas electroquímicas que auxilian en el estudio de la liberación de la hormona en tiempo real, como la amperometría con electrodos modificados que promueven la oxidación de la insulina (Gorski y col., 1997; Hiriart y Aguilar-Bryan, 2008; Lacinova, 2005; Sakmann y Neher, 2009).

Páncreas

El páncreas es una glándula retroperitoneal posterior al estómago, y se extiende desde el duodeno hasta el bazo (Fig. 1). Está compuesto por dos grupos de células: las acinares, que producen el jugo pancreático que se secreta al duodeno para la digestión y los islotes de Langerhans, compuestos por diversos tipos celulares que vierten a la circulación sanguínea hormonas como insulina y glucagón (Netter y col., 2010).

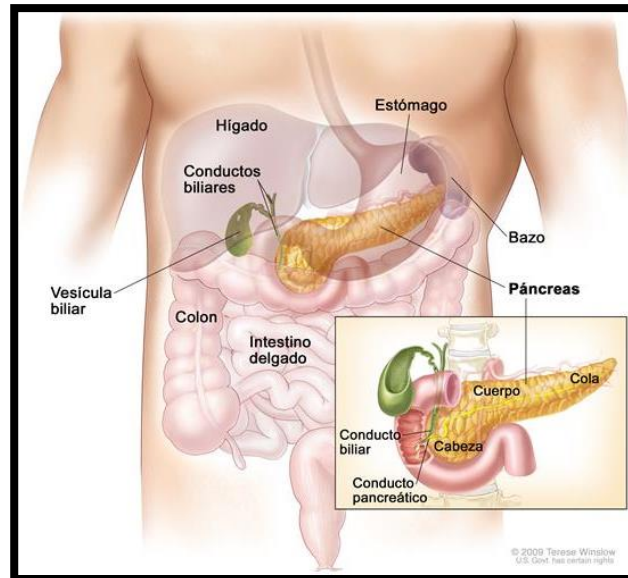


Figura 1. Posición anatómica del páncreas. El páncreas (amarillo) está situado posterior al estómago extendiéndose desde el duodeno hasta el bazo (Fuente: Winslow, 2009).

Las células acinares (Fig. 2) componen el tejido pancreático que lleva a cabo las funciones exocrinas de este órgano mediante secreciones necesarias para la digestión de los alimentos. Los acinos liberan jugo pancreático que neutraliza el contenido duodenal. Éste consta de una mezcla acuosa de sales, rica en bicarbonato, con un pH alcalino de 7.6 a 8.2. Del mismo modo, secreta enzimas para la digestión de carbohidratos, proteínas y grasas como lo son proteasas (tripsina y quimotripsina), lipasa y α -amilasa (Boron y Boulpaep, 2009b).

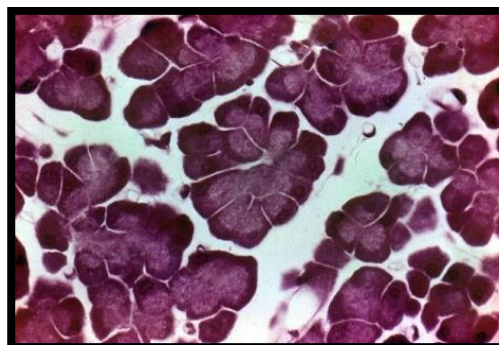


Figura 2. Células acinares del páncreas. Las células acinares conforman la mayor parte del páncreas. Corte histológico con tinción Hematoxilina-Eosina (Fuente: Fac.Med. UNAM, 2014).

El componente endocrino del páncreas está conformado por cúmulos de células denominadas islotes de Langerhans (Fig. 3). Estos están constituidos por cuatro tipos de células secretoras: alfa, beta, delta y PP. Las células alfa liberan glucagón, hormona con actividad hiperglucemiante. Por otra parte, las células beta liberan insulina, hormona proteica con efecto hipoglucemiante; además de proinsulina, péptido C y amilina. Las células delta liberan somatostatina que inhibe la secreción de insulina y glucagón. Finalmente las células PP, también conocidas como células F, segregan polipéptido pancreático relacionado con la saciedad, retraso en el vaciamiento gástrico y reducción de la motilidad intestinal (In't Veld y Marichal, 2010; Simpson y col., 2012).

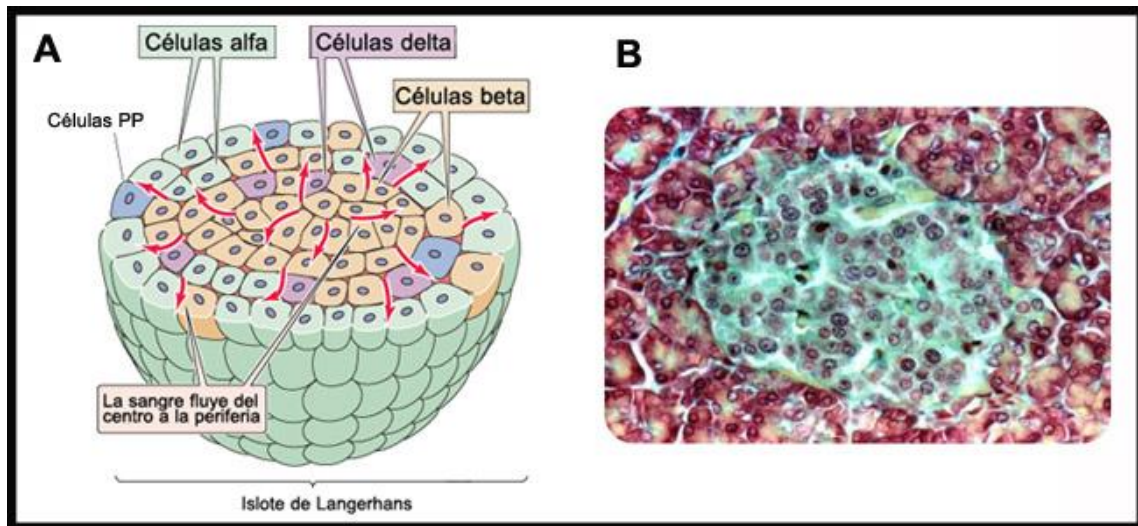


Figura 3. Islotes de Langerhans. A. Islote de Langerhans y sus cuatro tipos de células secretoras. **B.** Islote de Langerhans teñidos con Hematoxilina-Eosina. (A. Modificada de Boron y Boulpaep, 2009a; B. Fuente: Fac.Med. UNAM, 2014).

Las células beta son abundantes en los islotes pancreáticos en comparación con el resto de las células que los conforman ya que constituyen entre el 50 y el 80%; dichas células beta se encuentran distribuidas por todo el islote sin una organización aparente en el páncreas de los humanos, mientras que en el de rata se encuentran preferentemente en el centro del islote. Su importancia radica en la síntesis, almacenamiento y liberación de insulina por ser la única hormona con un efecto hipoglucemiante, esencial para el ingreso de glucosa a las células y supervivencia del organismo (Boron y Boulpaep, 2009a; In't Veld y Marichal, 2010).

Insulina

La insulina es una hormona peptídica de 5.8 KDa que se conforma de 2 cadenas polipeptídicas: A (21 aminoácidos) y B (30 aminoácidos), unidas por puentes de disulfuro. Esta hormona lleva a cabo diversas funciones en el organismo; la más relevante es la regulación eficiente del metabolismo de glucosa, lípidos y proteínas en los períodos de ayuno y postprandiales (Olivares y Arellano, 2008).

Tras un período de ayuno, la célula beta pancreática segrega pequeñas cantidades de insulina lo que provoca, en primera instancia, la glucogénesis hepática. Posteriormente, se movilizan lípidos del tejido adiposo para la formación de precursores de la cetogénesis, y en última instancia promueve la utilización de aminoácidos; de esta manera, proporciona energía para el organismo (Boron y Boulpaep, 2009a).

Por el contrario, después de la ingesta de alimentos, la célula beta libera mayores cantidades de insulina, lo que reduce el uso de las reservas endógenas del cuerpo y promueve la restitución de las utilizadas. Asimismo, la insulina promueve el ingreso, y por consecuencia el metabolismo de glucosa en las células, principalmente en órganos como hígado, músculo y tejido graso; por lo que se reducen los niveles de glucosa en sangre y se mantiene dentro de límites bien definidos su concentración (Boron y Boulpaep, 2009a; Olivares y Arellano, 2008).

Liberación y regulación de insulina

Para llevar a cabo sus funciones, la insulina debe ser liberada al torrente sanguíneo. El requerimiento diario de la hormona es de 40 UI. El contenido promedio de insulina por vesícula secretora es de 8 fg; por lo que se estima que se liberan aproximadamente 10^{12} vesículas de insulina de las células beta pancreáticas por día (In't Veld y Marichal, 2010).

La insulina es secretada en respuesta a diversos estímulos, uno de ellos y el principal es el incremento en los niveles plasmáticos de glucosa, la cual proviene de 3 fuentes: absorción intestinal tras la ingesta de alimentos, glucogenólisis, y gluconeogénesis (Giugliano y col., 2008). La liberación de insulina requiere del ingreso de glucosa a la célula beta pancreática; el ATP producido por el metabolismo de este carbohidrato promueve una señalización intracelular

que finaliza con la fusión de las vesículas de insulina con la membrana celular (Hiriart y Aguilar-Bryan, 2008; Mears, 2004; Seino, 2012).

La célula beta se encuentra en un potencial de membrana basal durante los períodos de ayuno, cuando la concentración de glucosa en sangre oscila entre 5-6 mM. Al elevarse los niveles de glucosa a 10 mM o más, se estimula el ingreso del carbohidrato a la célula por difusión facilitada, a través de los transportadores GLUT-2. Dentro de la célula, la glucosa se metaboliza por lo que incrementa la concentración de ATP; este aumento estimula el cierre de los canales de K⁺ dependientes de ATP. Debido al cierre de estos canales, la concentración de K⁺ intracelular aumenta, por lo que se produce un cambio en el potencial de la membrana basal a un potencial despolarizante. Los canales de Ca²⁺ sensibles al voltaje se abren en respuesta a dicho cambio de potencial y se promueve una corriente de calcio al interior de la célula. El incremento en la concentración de Ca²⁺ intracelular estimula la fusión de las vesículas de insulina en la membrana celular (Fig. 4) (Hiriart y Aguilar-Bryan, 2008).

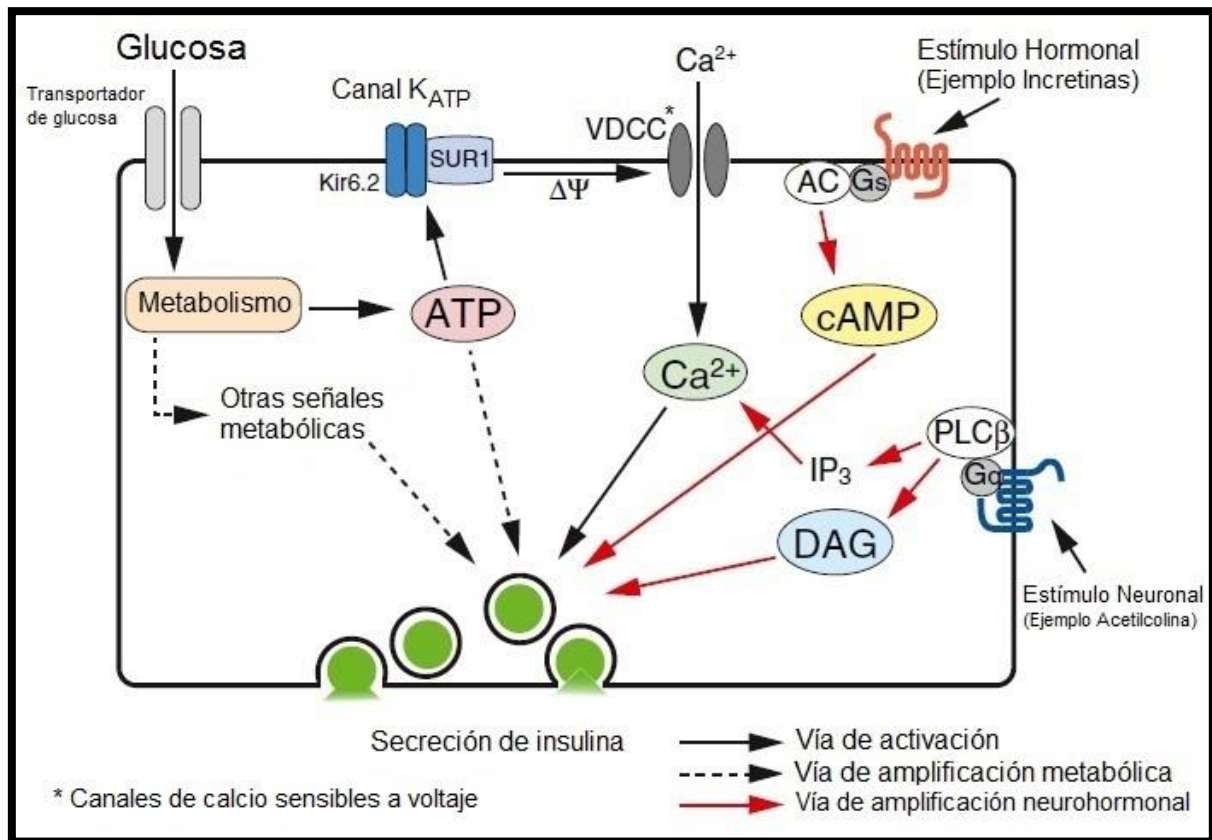


Figura 4. Liberación de insulina. Proceso de la liberación de insulina y sus diferentes vías de señalización (Modificada de Seino, 2012).

La función de la insulina es la homeostasis de la glucosa, ya que incrementa el ingreso de la misma a diversos tipos de células para la producción de energía. La respuesta a los cambios en la concentración extracelular de glucosa es bifásica; cuando la concentración aumenta del estado basal a uno estimulante se observa una liberación rápida de insulina dentro de los primeros minutos, a este proceso se le conoce como primera fase. Si la glucosa se mantiene en niveles altos, se estimula una segunda fase. Esta fase es de menor intensidad que la primera y se conserva hasta alcanzar niveles basales de glucosa (Straub y Sharp, 2002; Zawulich y col., 2008).

La insulina inicia sus acciones biológicas por la unión a los receptores específicos localizados en la membrana de sus células diana. El receptor de insulina (IR) es una glucoproteína que pertenece a la familia de receptores con actividad intrínseca de cinasas de tirosina. Una vez que los receptores son estimulados por su ligando se autofosforilan en sus residuos de tirosina, lo que inicia una cascada de señalización por dos vías principales de transducción: la vía de PIK3 y la vía de MAP cinasas (Olivares y Arellano, 2008).

Existen varios mecanismos homeostáticos para regular la glucemia en el organismo, por lo que moléculas que afecten la secreción de la insulina tienen un papel muy importante en ellos. Se ha demostrado que la ingesta oral de glucosa provoca una mayor liberación de insulina que la aplicación de glucosa intravenosa; se sugiere que es debido a la secreción de hormonas gastrointestinales (Creutzfeldt, 1979; Madsbad y col., 1983), llamadas incretinas. Estas hormonas son liberadas durante la alimentación y potencian la liberación de insulina mediante su unión a receptores específicos en las células beta. Asimismo, existen diversos fármacos que pueden inducir la liberación de insulina cuando se presenta una disfunción en los mecanismos de liberación, por ejemplo cuando se desarrolla DM2 (Stingl, 2007).

Células beta

Como se mencionó anteriormente, el estudio de la liberación de insulina se lleva a cabo en células únicas, por ello es necesario contar con un cultivo de células beta. Existen diversos cultivos los cuales pueden ser primarios de ratón, rata u algún otro animal; o bien líneas celulares como la INS-1 (rata) o β -TC (ratón). De los numerosos modelos celulares existentes, las células beta de rata se asemejan a las humanas porque comparten características de la liberación de insulina, así como poblaciones de VDCC involucrados en ella (Hiriart y Aguilar-Bryan, 2008).

Los cultivos celulares primarios se conforman de una mezcla de poblaciones, sí bien las células beta son las más abundantes, por lo que se requiere de parámetros precisos para su identificación. Estas células son difíciles de distinguir por tamaño y forma; sin embargo algunas características electrofisiológicas de estas células ya están descritas en la literatura (Hiriart y Aguilar-Bryan, 2008; Lacinova, 2005).

La capacitancia de membrana, es la carga almacenada en la membrana de una célula (medida en pF) la cual está relacionada de manera directa con la dimensión de la misma. Por lo tanto la capacitancia es indirectamente un indicador del tamaño de una célula (Hille, 2001). Este parámetro es utilizado para diferenciar a las células que componen los islotes: las células beta pancreáticas tienen una capacitancia entre 6-12 pF. Por debajo de 5 pF se consideran células alfa y por arriba de 15 pF se consideran células acinares, que aunque no pertenecen al islote se encuentra en el cultivo celular (Velasco y col., 2012; Zhuang y col., 2000).

Otra característica notable de las células beta son los VDCC. En el artículo de Ammälä y colaboradores en 1993 (Fig. 5), se sugiere que existe una relación entre la amplitud de corriente entrante de calcio por VDCC, la concentración del calcio intracelular y un cambio en la magnitud de la capacitancia de membrana. Los tres parámetros tienen una relación directa, una mayor entrada de calcio se refleja en un incremento en la concentración de calcio intracelular que promueve un cambio proporcional en la capacitancia de membrana. Este cambio está relacionado a la cantidad de vesículas que se fusionen en ella (Ammälä y col., 1993).

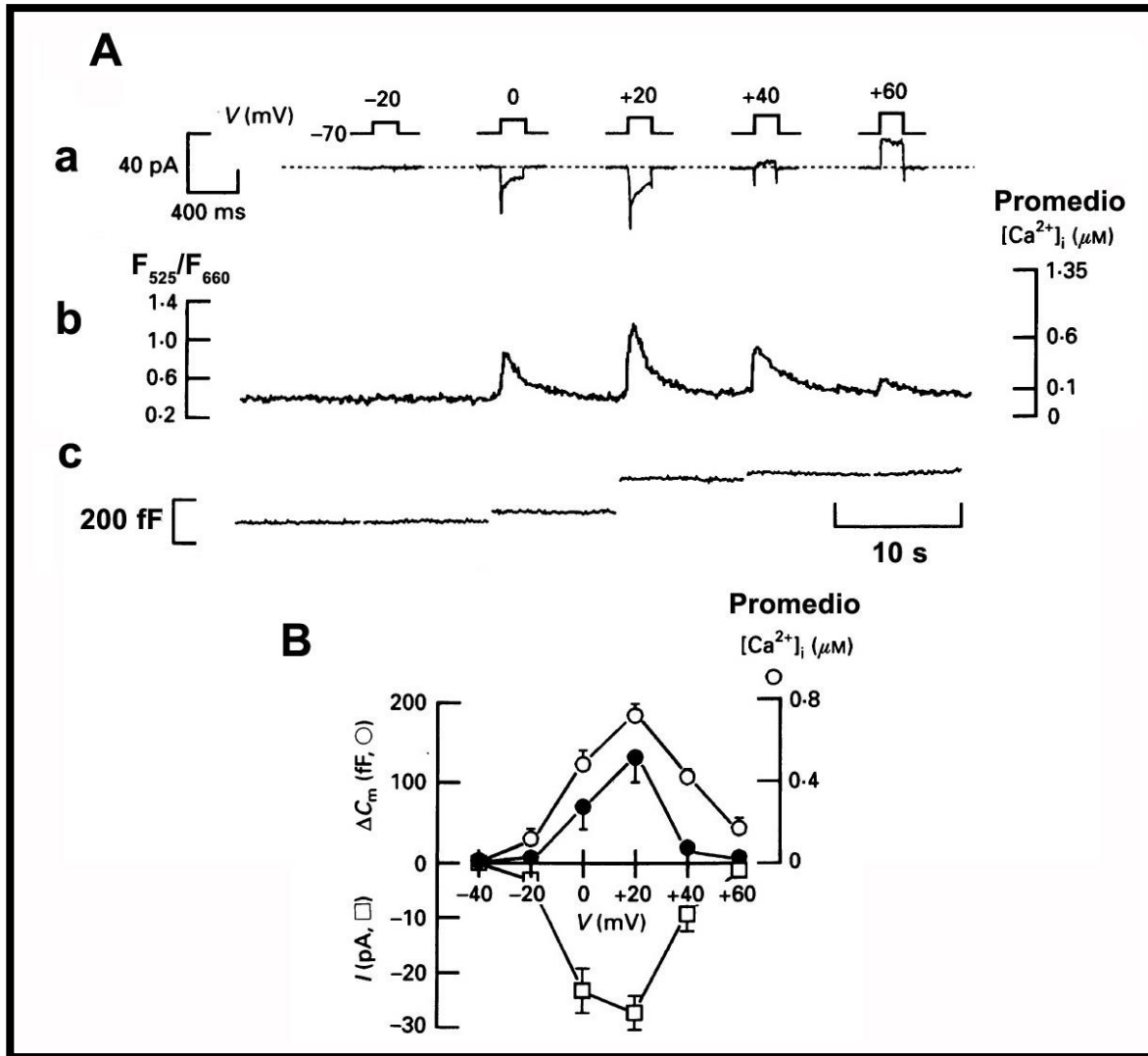


Figura 5. Relación entre las corrientes de calcio, el calcio libre intracelular y capacitancia de membrana. **Aa.** Indica la aplicación de diferentes pulsos de voltaje y la amplitud de las corrientes de calcio, medidas por Patch-Clamp; un pulso de +20 mV induce la mayor entrada de calcio. **Ab.** Se muestra el incremento de calcio intracelular (tinción con indicadores Fura red y Fluo-3) en relación a las corrientes de calcio medidas en **Aa**. **Ac.** Incremento en la capacitancia de membrana en relación a **Aa** y **Ab**. **B.** Se observa la relación entre: ● Capacitancia en fF, ○ el pico de la concentración del calcio intracelular y □ la corriente de calcio en pA. (Modificada de Ammälä y col., 1993).

Los canales de calcio sensibles a voltaje se dividen en dos clases. Los canales que se activan a voltajes negativos por debajo de ~ -30 mV y se conocen como canales LVA. Asimismo, los canales que se activan a voltajes positivos por encima de ~ -10 mV, y se conocen

como canales HVA. Los canales LVA y HVA se subdividen en clases, dentro de los canales LVA se encuentra una gran clase denominada canales tipo T, mientras que dentro de los HVA se encuentran diversas clases como los canales tipo L, N, R, y p/q de acuerdo a las diferentes unidades estructurales que los componen (Lacinova, 2005).

En las células beta los canales HVA tipo L son la población de canales que se ha reportado están relacionados con la mayor entrada de calcio a la célula y por consiguiente, a la liberación de vesículas de insulina. Estos canales se han descrito co-localizados con las vesículas secretoras de insulina en células beta pancreáticas de ratón (Bokvist y col., 1995; Zhuang y col., 2000). Para el estudio de la corriente entrante en estos canales es preferible utilizar iones de bario como acarreador de carga. Ésto permite registrar corrientes más amplias, ya que el bario es más permeable en los canales VDCC; lo cual es una ventaja sobre todo cuando las corrientes de calcio son menores a 100 pA de amplitud, como es el caso de las corrientes en células beta (Hiriart y Aguilar-Bryan, 2008; Lacinova, 2005).

Los canales de calcio tipo L presentan una sensibilización farmacológica a las dihidropiridinas (1,4-DPH) como la nifedipina. Esta sensibilización resulta en la inhibición de la entrada de calcio específicamente en estos canales; en células beta se ha reportado que aproximadamente el 40% de la corriente proviene de canales tipo L (Lacinova, 2005; Taylor y col., 2005) y es por ello que esta prueba farmacológica auxilia en la identificación de las células beta pancreáticas. Otro componente importante del estudio farmacológico de los VDCC, es la inhibición por cadmio. 100 μ M de este ión, de acuerdo con la literatura internacional, bloquea el 100% de la corriente (Yaari y col., 1987), lo que permite asegurar que la corriente registrada es a través de los canales de calcio sensibles a voltaje. Con estos parámetros es posible identificar a las células beta pancreáticas en un cultivo celular primario, al diferenciarlas por su capacitancia y su población de canales de calcio.

Voltametría y Amperometría

El estudio de la exocitosis es relevante en las ciencias biológicas ya que permite comprender la cinética de liberación de las células secretoras; tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. En el caso de la célula beta pancreática es relevante el estudio de la cinética de liberación de las vesículas de insulina, para elucidar los componentes que conllevan a este evento (Kennedy y col., 1993).

La voltametría y la amperometría son técnicas electroquímicas que se basan en reacciones de óxido-reducción; las cuales producen movimientos de electrones que se registran como corriente. Dichas técnicas permiten estudiar eventos de liberación en tiempo real con alta resolución debido a que no son invasivas, son independientes de la morfología celular, y la exocitosis puede ser directamente monitorizada con electrodos posicionados a micras de la membrana celular. La utilidad de estos electrodos se debe al tamaño de las fibras de carbono que los componen (5 – 50 μm) (McCreery, 1995; Sakmann y Neher, 2009).

La voltametría utiliza protocolos de voltajes variables en rampa que se repiten cíclicamente. El protocolo que permite el estudio de los puntos de oxidación y reducción de una molécula corre de voltajes muy negativos (-700 mV) hasta positivos (+900 mV). Cada molécula tiene diferentes picos de oxidación y reducción; los cuales son variables según los grupos funcionales que la molécula posea. Los grupos funcionales definen el potencial redox de la molécula; el cual se refiere al estado donde la mitad de las moléculas se encuentran oxidadas y la otra mitad reducidas, por lo tanto en equilibrio (Sakmann y Neher, 2009).

Es común graficar voltametrías cíclicas (Fig. 6) para identificar los voltajes a los que reaccionan los picos de oxidación y reducción de una molécula. El principal uso de la voltametría ha sido el distinguir entre las diversas monoaminas, como lo son: serotonina, dopamina, adrenalina y noradrenalina (Sakmann y Neher, 2009).

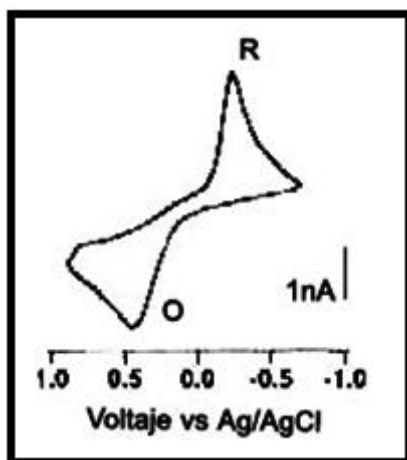


Figura 6. Voltametría cíclica de noradrenalina. Voltamograma de aplicación de 1mM de noradrenalina; se distingue un pico de reducción y un pico de oxidación. (Modificada de Sakmann y Neher, 2009)

Por otro lado, la amperometría consiste en aplicar un pulso de voltaje fijo en un electrodo detector posicionado a unas micras de distancia de la célula secretora. Dicha célula se estimula, lo cual promueve la liberación de los componentes de las vesículas; éstos reaccionan con la superficie del electrodo promoviendo una corriente. Dicha corriente es registrada en forma espigas amperométricas (Fig. 7) (Gorski y col., 1997; Huang y col., 1995; Koh, 2006).

La amperometría favorecer la oxidación de las moléculas, y también aunque con menor frecuencia se utiliza esta metodología para reducirlas. Para esto se debe de aplicar un voltaje que exceda el potencial redox, usualmente se excede el potencial por lo menos 200 mV (Sakmann y Neher, 2009).

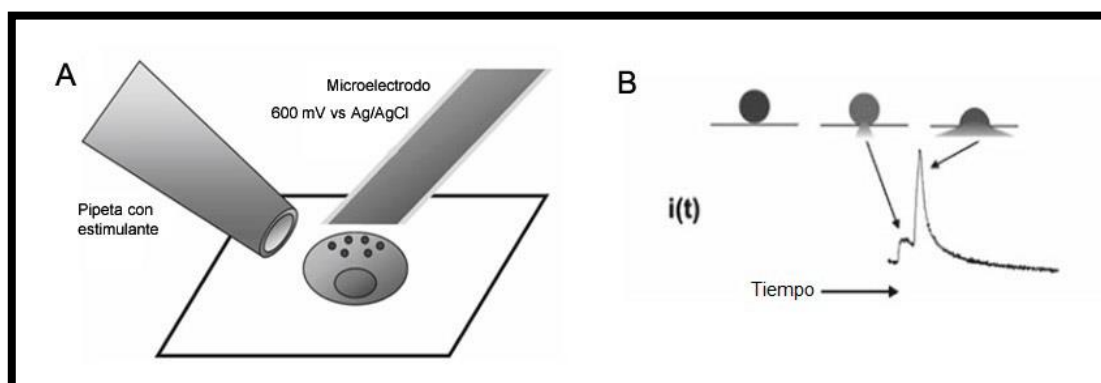


Figura 7. Registro amperométrico de la liberación de un gránulo de noradrenalina. A. Amperometría. Se aplica un pulso con un voltaje mayor al potencial de redox; 600 mV es suficiente para oxidar noradrenalina **B.** Registro de espigas amperométricas en función del tiempo. Se registra el cambio de corriente en el electrodo al fusionarse la vesícula con la membrana celular y entrar en contacto con la superficie del electrodo. (Modificada de Heien y Ewing, 2009).

Los componentes liberados de las células secretoras son por lo general moléculas fácilmente oxidables o reducibles. Las moléculas más estudiadas mediante esta metodología son las monoaminas. Algunos otros componentes no son igualmente oxidables o reducibles, como la insulina; para ello existen técnicas que promueven la catálisis de su oxidación mediante la modificación de los electrodos, lo cual se detalla más adelante (Gorski y col., 1997; Huang y col., 1995; Kennedy y col., 1993).

Electrodos

Para la detección de productos secretados por las células se requiere de un detector apropiado, es decir de un electrodo polarizable. Al sumergirse un electrodo con esta propiedad en una solución conductora (ejemplo solución Ringer), la corriente eléctrica es acarreada por los iones disueltos en ella; tales como Na^+ , K^+ Cl^- hacia la superficie del electrodo, donde la corriente se da por el movimiento de electrones de los grupos funcionales de la fibra de carbono.

Las moléculas oxidables disueltas en solución entran en contacto con la superficie del electrodo promoviendo la transferencia de electrones de la interfase líquida a la sólida. Por ello, es necesario aplicar un voltaje por encima del valor del potencial de redox para promover la oxidación de dichas moléculas. Además, el voltaje provoca una acumulación de carga en la superficie del electrodo que facilita la conducción (Sakmann y Neher, 2009).

Al inicio del desarrollo de las técnicas electroquímicas, los electrodos utilizados eran de diferentes metales, principalmente oro y platino. Sin embargo, estos electrodos presentaban deficiencias en características primordiales para un buen registro como en la estabilidad. Debido a la composición de la superficie de dichos electrodos, las moléculas son adsorbidas por lo que existe un decaimiento en su utilidad. Además, presentaban una baja sensibilidad y mayor nivel de ruido (Zhou y Mislser, 1996). El ruido se define como la señal en tiempo discreto y amplitud continua introducida por el proceso de cuantificación.

Electrodos de fibra de carbono. Las fibras de carbono fueron, a la par de los metales, utilizadas como electrodos y se pudieron percibir muchas diferencias que las hacían más ventajosas (Fig. 8). Debido a la información relevante que se obtiene de las técnicas electroquímicas, en la actualidad, es casi exclusivo el uso de fibras de carbono para la elaboración de electrodos.

Los electrodos de fibra de carbono tienen diferentes propiedades eléctricas y químicas en su superficie, dadas por los grupos funcionales oxidables en ellas (McCreery, 1995). Estos grupos están íntimamente relacionados con las ventajas que ofrecen estos electrodos como lo son: su geometría, tamaño, alta sensibilidad, bajo ruido, estabilidad y las modificaciones disponibles para aumentar su selectividad (Zhou y Mislser, 1996).

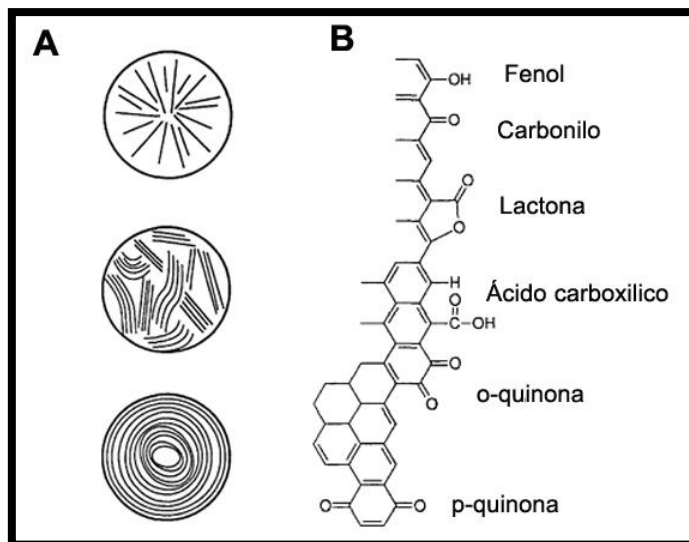


Figura 8. Características de la superficie de una fibra de carbono. A. Existen diferentes arreglos de una fibra (de arriba a abajo): radial, al azar o en capas. B. Grupos funcionales representativos. Los diversos grupos funcionales que se encuentran en la superficie de la fibra facilitan la óxido-reducción de las moléculas a estudiar (Modificada de McCreery, 1995).

Modificaciones. La amperometría es útil para el estudio de la liberación de diversas moléculas en células secretoras. Sin embargo, no todas las moléculas pueden ser analizadas a menos que se realice una modificación en el electrodo para catalizar las reacciones de óxido-reducción (Kennedy y col., 1993; McCreery, 1995).

La característica electroactiva más estudiada de la insulina son sus 3 puentes de disulfuro (Fig. 9). Uno de ellos se encuentra expuesto debido a la estructura de esta hormona; el cual se ha demostrado es el más electroactivo. Otro puente de disulfuro se encuentra parcialmente cubierto en la estructura, y tiene una probabilidad del 50% de reaccionar. El tercer puente se encuentra totalmente cubierto y no es probable que reaccione. Por lo que en promedio con un electrodo modificado para favorecer la oxidación de insulina se espera que reaccionen 1.5 puentes de disulfuro por molécula (Kennedy y col., 1993).

La modificación de los electrodos consiste en sumergir dicho electrodo en una solución con algún compuesto que lo haga más selectivo y someterlo a un protocolo de voltametría para favorecer el depósito de dicho compuesto en la superficie del electrodo.

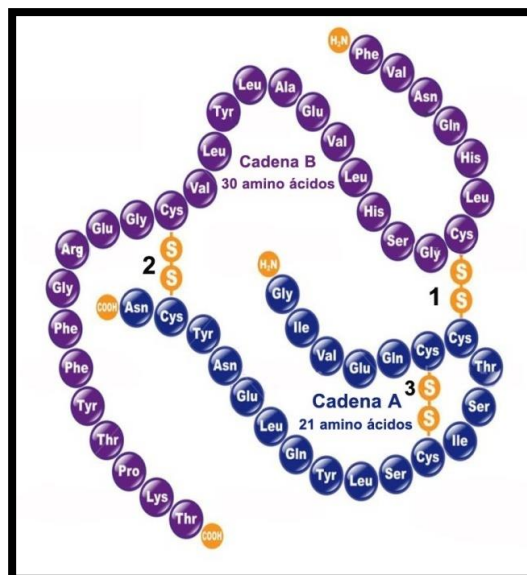


Figura 9. Puentes de disulfuro de insulina. Se muestran los 3 puentes de disulfuro de la insulina, del 1 al 3, siendo 1 el más electroactivo y expuesto; el número 2 tiene una probabilidad de 50% de reacción y el número 3 debido a la conformación de la cadena A, no está expuesto para reaccionar (Fuente: Kennedy y col., 1993).

Compuestos de rutenio. La detección mediante amperometría de diversos compuestos con puentes de disulfuro, incluida la insulina, ha sido reportada con electrodos modificados con una capa fina de cianorutenato $(CN)_6Ru^{II}CNRu^{II}(CN)_5$ y óxido de rutenio $(Ru-O \vdash CN-Ru)$. Se desconoce, en detalle, el mecanismo de estos compuestos para favorecer la catálisis de la oxidación (Kennedy y col., 1993).

Sin embargo, existe evidencia en trabajos realizados con cisteína, que un pulso de voltaje de +0.65 V reduce los puentes de disulfuro a grupos tiol. Estos grupos son muy reactivos y por ello, en ausencia de compuestos de rutenio, se adsorben a la fibra de carbono. La modificación con rutenio favorece la transferencia de oxígeno al grupo tiol oxidándolo (Fig. 10). De esta forma, es posible la detección amperométrica de insulina (Cox y Gray, 1990; Kennedy y col., 1993). La transferencia de oxígeno al grupo tiol además de promover un traspaso de electrones a la superficie del electrodo, es importante ya que evita que el producto de la reducción (radicales tiol), se adsorba a la superficie del electrodo, manteniendo la estabilidad del mismo (Huang y col., 1995).



Figura 10. Reacción de grupos tiol con compuestos de rutenio. Reacción propuesta que se promueve en presencia de compuestos de rutenio tras la formación de grupos tiol. (Fuente: Cox y Gray, 1990)

La modificación con compuestos de rutenio permite la detección de insulina (Kennedy y col., 1993; Huang y col., 1995). Sin embargo, su principal desventaja es la inestabilidad de la modificación a pH fisiológico (pH 7.2-7.4), por lo que la vida media de un electrodo es corta. Otros estudios demostraron que el cloruro de rutenio $\text{RuCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, al disolverse en una solución ácida modifica, de igual manera, los electrodos de fibra de carbono. A diferencia de otros compuestos, el cloruro de rutenio forma capas estables en pH fisiológico (Gorski y col., 1997).

MATERIALES Y MÉTODOS

Voltametría

Para implementar la técnica de voltametría, fue necesario estandarizar la fabricación de los electrodos de fibra de carbono; dicha fabricación se realizó con fibras de 10 μM de diámetro. Para su elaboración se utilizaron puntas para micropipeta. Primeramente, la fibra se lavó con etanol y después se insertó en la punta de micropipeta con una longitud aproximada de 2- 3 cm. Se colocó la punta en un estirador para electrodos (Fig. 11), donde se introdujo una porción de la punta en una resistencia. El calor de la resistencia y un movimiento súbito permitió estirar y recubrir con plástico la fibra de carbono (Koh y Hille, 1999).

Previo al uso del electrodo, se realizó un corte fino en la punta para exponer una parte de la fibra que quedó recubierta de plástico y se sumergió en propanol por 2 minutos. Para su uso se llenó la punta de micropipeta con una solución conductora de 3 M de KCl; la cual permite el contacto con el alambre de plata clorurado una vez insertado en el cabezal del amplificador para dar continuidad eléctrica.

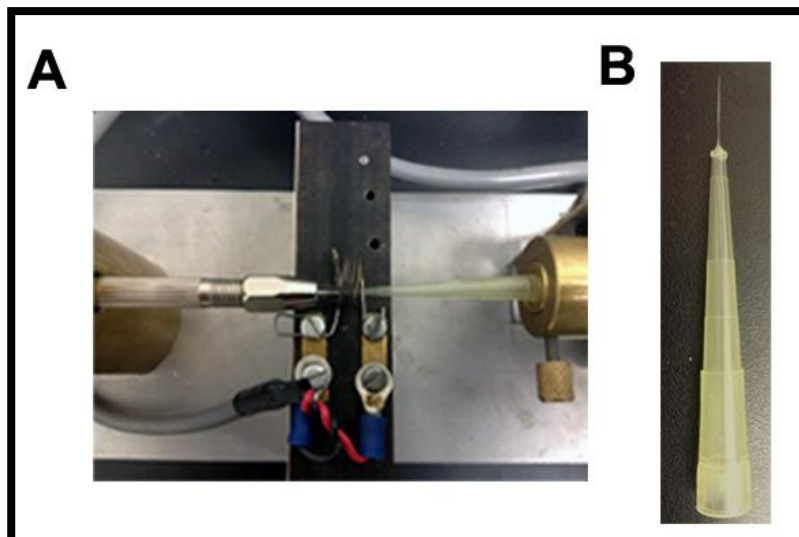


Figura 11. Elaboración de electrodos de fibra de carbono. A. La punta de micropipeta con la fibra de carbono se posiciona en la resistencia y se sujeta del lado opuesto. Se aplica calor y al

derretirse el plástico se estira la punta con un movimiento rápido. **B.** Se muestra el resultado del estiramiento, un electrodo con la fibra de carbono recubierta de poliestireno.

El registro de las técnicas electroquímicas se adquirió con un amplificador GeneClamp500 con el software pClampex 6, todas las señales adquiridas fueron filtradas con un filtro análogo de 25Hz. El protocolo utilizado fue una rampa que corre desde -0.7 V hasta +0.9 V a una velocidad 400 V/s con una duración de 15.10 ms para el registro de la voltametría (Sakmann y Neher, 2009).

La voltametría hidrodinámica es una versión de la voltametría donde únicamente se inyecta la sustancia que se desea analizar. El electrodo se sumerge en una disolución conductora y se posiciona un inyector a micras de su superficie; de esta manera sólo la aplicación de la sustancia será lo que de señal. En esta metodología no se utilizan células. Para ésta implementación utilizamos serotonina 1 mM, ya que es más estable en solución que otras monoaminas. Se colocó un electrodo recién elaborado en el cabezal del amplificador, para el registro control se corrió el protocolo a la vez que se inyectó solución de Ringer. Posteriormente, se inyectó serotonina 1 mM (Sakmann y Neher, 2009).

La señal se analizó en Origin 8.0 para elaborar la voltametría, el aislamiento de los picos de oxidación y reducción así como la voltametría cíclica. Los resultados de la voltametría cíclica se muestran en promedio \pm error estándar.

Modificación de Electrodo con Cloruro de Rutenio

Para el registro de insulina, fue necesario contar con electrodos modificados. Dicha modificación se promovió con 30 mM de cloruro de rutenio; el protocolo de ciclado corre de -0.8 V a +0.65 V a una velocidad de 100 V/ms durante 15 min. Este protocolo favoreció el depósito de capas de rutenio en la superficie del electrodo (Gorski y col., 1997).

La solución de cloruro de rutenio 30 mM fue elaborada disolviendo 6 mg de RuCl_3 en 10 mM de HClO_4 ; la disolución fue sonicada durante 5 min previo a su uso. Posteriormente el electrodo se cicló sumergido en dicha disolución 15 min y después del ciclado se dejó secar por más de 2 h previo a su utilización (Gorski y col., 1997; Huang y col., 1995; Wang y col., 2007).

Registro Amperométrico Hidrodinámico de Insulina

La amperometría hidrodinámica es una versión de la amperometría, en el cual se inyecta únicamente la sustancia que se desea analizar. Esta técnica es útil para la estandarización de la amperometría; la versión hidrodinámica no utiliza células.

El registro amperométrico hidrodinámico se llevó a cabo con un electrodo modificado. El protocolo utilizado fue un pulso sostenido a +0.65 V (voltaje suficiente para la oxidación de insulina) por 10 s. Se posicionó un electrodo modificado en solución de Ringer, después se ajustó el inyector a micras de distancia de dicho electrodo. Para un trazo control se corrió el protocolo y se inyectó solución Ringer; posteriormente se reinició el protocolo y se inyectó insulina 1mM para registrar la oxidación de dicha molécula (Gorski y col., 1997). La señal adquirida fue analizada con el software Origin 8.0. Los resultados se reportan en promedio \pm error estándar.

Preparación De Cultivo De Células Beta Pancreáticas

Se utilizaron ratas macho Wistar con peso entre 240-300g. Los animales fueron obtenidos de la Unidad de Bioterio de la Facultad de Medicina en la UNAM y mantenidos en condiciones estándar a 25°C con periodos de 12 h de luz-oscuridad, recibiendo agua y alimento *ad libitum* y siguiendo lo estipulado en la Norma Oficial Mexicana de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

La metodología utilizada para la extracción del páncreas y el aislamiento de células beta se realizó de acuerdo a lo reportado por el grupo de Hiriart (Velasco y col., 2012). Para la extracción del páncreas, los animales fueron anestesiados mediante la inyección de 1ml de pentobarbital vía intraperitoneal. Una vez dormido el animal, se realizó una incisión en el tórax y se expuso el hígado; después se localizó el páncreas donde se identificó el conducto pancreático. En el conducto se realizó una incisión donde se introdujo una manguera para insuflar el órgano con solución de Hanks fría. Esto se realizó pinzando el conducto del lado del intestino para asegurar que sólo se insuflará el páncreas. Se removió el páncreas cuidadosamente, evitando cortar el intestino y el bazo. El órgano se colocó en un vaso de precipitado con solución fría de Hanks donde se realizaron varios lavados y removió cualquier

contaminación de sangre. La posible contaminación por tejido adiposo fue fácilmente removida, ya que al tener una baja densidad, éste tejido flota en la solución de Hanks.

Una vez limpio el páncreas se traspasó a un vaso de precipitado con 6 mg de colagenasa y se adicionaron 20 ml de solución de Hanks fría. Se cortó el páncreas en pedazos pequeños para mejorar la digestión enzimática; posteriormente se colocó el tejido con la enzima colagenasa en baño maría a 37 °C por 10 min agitando fuertemente durante la incubación. Transcurridos los 10 min, se adicionó solución de Hanks a temperatura ambiente para inactivar a la colagenasa, y se tamizó la digestión para separar el tejido no digerido del que si se digirió. El tejido digerido se colocó en un tubo con fondo cónico y fue centrifugado a 850 rpm durante 10 min. Se removieron tres cuartas partes del sobrenadante y se adicionó de nuevo solución de Hanks, se agitó el botón celular formado y se repitió este lavado dos veces más para remover toda la colagenasa.

Una vez finalizados los lavados se vació el botón celular resuspendido en una caja de petri con fondo oscuro. Con ayuda de una pipeta pasteur se seleccionaron los islotes pancreáticos; los islotes no flotan y son cúmulos blancos que sobresalen en el fondo oscuro. Una vez finalizada la selección de los islotes, se traspasó la suspensión celular a un tubo con fondo cónico y se centrifugó a 850 rpm por 5 min. Después se removió el sobrenadante y se adicionó 1 ml de solución EDTA-tripsina (10x) al botón celular resuspendido. Se dejó reposar 5 min en baño maría los islotes con la tripsina, y después se dispersaron. Se adicionó medio RPMI con suero fetal bovino al 10% para inactivar a la tripsina y se centrifugó a 850 rpm por 7 min la suspensión; se removió el sobrenadante y se adicionó de nuevo RPMI, se lavó así dos veces más. Después del último lavado, se sembró el botón celular en cajas de petri con medio RPMI; las cajas contenían poli-lisina para promover la adherencia celular. Los cultivos de células beta pancreáticas se incubaron por 24 h previo a su uso.

Registros Electrofisiológicos De Células Beta Pancreáticas

La técnica de Patch-Clamp es utilizada para el estudio de corrientes iónicas a nivel poblacional o individual de canales iónicos. La técnica consiste en formar un sello de alta resistencia o gigasello con la membrana de la célula a estudiar (Fig. 12). La formación del gigasello se lleva a cabo al acerca una micropipeta de vidrio a la membrana celular, cuando ésta entra en contacto con la membrana ambas se adhieren una a la otra. Después de la adhesión se aplica succión

para formar el gigasello, el cual se ve favorecido por una solución que contenga calcio (Fig.12A). Una vez formado el gigasello se aplica un voltaje de -40 mV para promover su ruptura (Fig.12B); al romperse el sello se adquiere la configuración de célula completa (Hamill y col., 1981).

Las ventajas de utilizar la configuración de célula completa son: el control del citoplasma por medio de la solución interna que se aplica a través de la micropipeta y el registro de los cambios de toda la membrana celular (Polder y col., 2005).

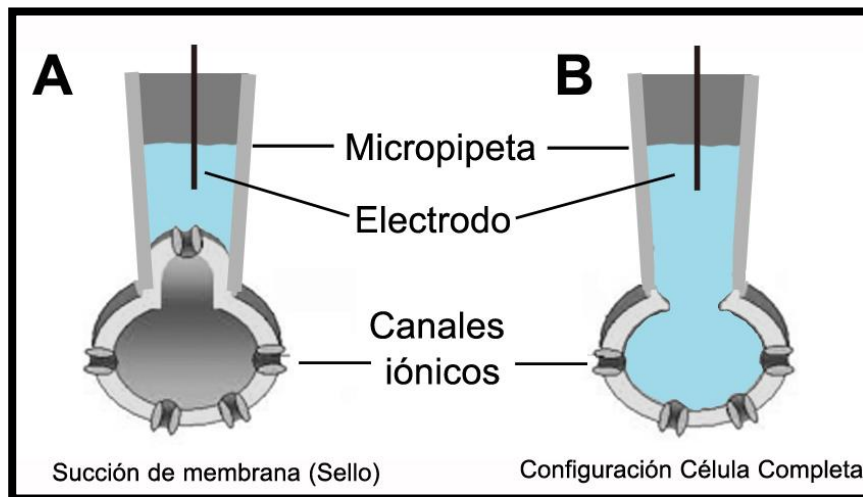


Figura 12. Esquema de Patch-Clamp en configuración de célula completa.

A. Se observa la formación del gigasello como el resultado de la succión de una porción de la membrana. **B.** Configuración en célula completa después de la ruptura del sello.

Las corrientes fueron registradas con un amplificador HEKA EPC9 a temperatura ambiente. Se utilizaron micropipetas de borosilicato con una resistencia de 3-4 MΩ. La solución de sello contenía (en mM): 160 NaCl, 2.5 KCl, 5 CaCl₂, 10 Hepes, 8 Glucosa, 1 MgCl₂. La solución externa para el registro de las corrientes contenía (en mM): 125 NaCl, 5 MgCl₂, 10 Hepes, 10 Glucosa, 10 BaCl₂ • 2 H₂O, 0.0001 TTX. La solución interna contenía (en mM) 140 CsCl, 32 TEA-Cl, 10 Hepes, 0.1 Bapta, 1 MgCl₂, 3 Na₂ATP, 3 Na₂GTP, 0.1 Leupetina. Todas las soluciones se ajustaron a pH 7.4 (Velasco y col., 2012).

Las propiedades farmacológicas de los canales de calcio son bien conocidas (Lacinova, 2005). Para su evaluación se utilizó 100 μM cadmio para verificar que las corrientes fueran de calcio. Asimismo, para evaluar el porcentaje de canales tipo L que constituían la corriente se

utilizó 5 μM de nifedipina como se mencionó anteriormente, ya que este fármaco inhibe a éstos canales de manera específica (Taylor y col., 2005; Yaari y col., 1987). El protocolo utilizado para registrar las corrientes de calcio fue un pulso cuadrado de -80 mV a -10 mV con una duración total de 15 ms (Figura 17B). Los resultados se reportan en promedio \pm error estándar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Voltametría

La voltametría es una técnica electroquímica que se basa en reacciones de óxido-reducción para el análisis *in vivo* de eventos como la excitotoxicidad. Esta técnica también es utilizada en su versión hidrodinámica para el análisis de los puntos de oxidación y reducción de diversas moléculas. Los resultados de este trabajo de tesis, muestran la estandarización de la técnica de voltametría hidrodinámica replicando lo ya reportado por el grupo de Sakmann (Sakmann y Neher, 2009) mediante el análisis de la voltametría de serotonina como se muestra en la figura 13.

El protocolo utilizado para la estandarización fue elaborado según lo reportado por el grupo de Sakmann (Sakmann y Neher, 2009) como se muestra en la figura 13A. El estudio de la serotonina por voltametría es bien conocido y ha sido reportado por el mismo grupo como se muestra en la figura 13B; la línea continua representa el trazo en respuesta a la aplicación del protocolo en ausencia de serotonina, mientras que la línea punteada muestra la respuesta a la inyección de serotonina 1 mM. Para el análisis de los picos que se observan en los trazos, es necesario aislarlos, esto se realiza restando la línea punteada a la línea continua. Como se observa en la figura 13C, del resultado de la resta destacan tres picos, dos de reducción y uno de oxidación.

Una vez obtenida la voltametría de serotonina, se grafican los datos de corriente contra voltaje para obtener una voltametría cíclica. La voltametría cíclica brinda información acerca de los voltajes a los que aparecen los picos de oxidación y reducción de una molécula. Debido a esto, las voltametrías cíclicas nos ayudan a diferenciar entre las diversas monoaminas, según lo propuesto por el grupo de Sakmann.

Utilizando los parámetros establecidos por el grupo antes citado replicamos los experimentos previamente mencionados, los resultados se muestran en las figuras 13E, F y G; se puede observar que el registro de serotonina se reproduce y coincide con lo reportado por otros autores (Sakmann y Neher, 2009; Michael y col., 1999; Davidson y Stamford, 1997). En el análisis de los resultados se puede observar la presencia de tres picos (Fig. 13F), los cuales tienen una gran similitud con los de la figura 13C. Se puede observar que ambas figuras

presentan un pico de oxidación y dos picos de reducción; de éstos últimos el primer pico es más pronunciado que el segundo pico.

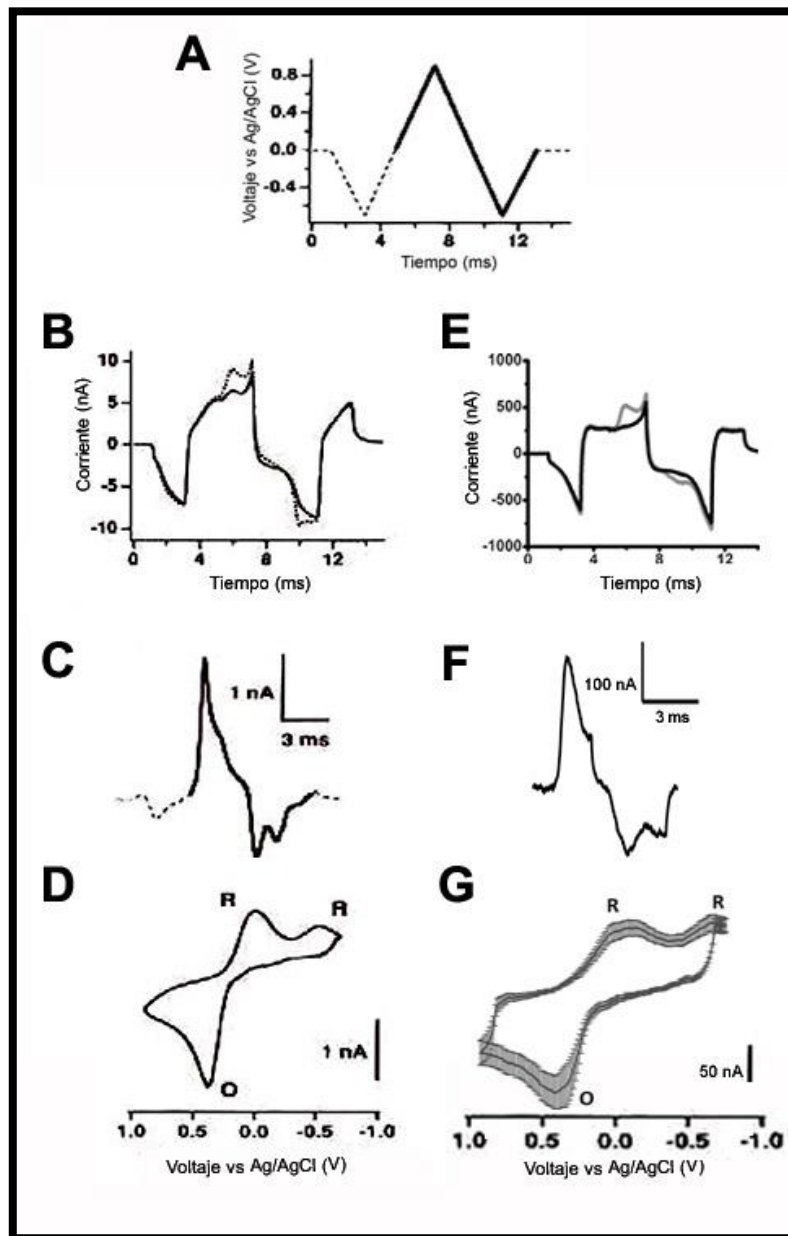


Figura 13. Voltametría de serotonina. **A.** Protocolo de voltaje usado en los registros. Rampa de -0.7 V a +0.9 V con respecto al electrodo de referencia Ag/AgCl con una velocidad de 400 V/s. **B** y **E.** Registro de la corriente en respuesta al protocolo de voltaje mostrado, en ausencia (línea continua) y presencia (línea punteada) de serotonina 1 mM. **C** y **F.** Resta de la línea continua menos la línea punteada para la obtención de los picos de óxido-reducción de

serotonina. **D** y **G**. Voltametría cíclica de serotonina. R, pico de reducción, O, pico de oxidación.

Para el panel **G**, n=17. Paneles **A-D** Modificados de Sakmann y Neher, 2009, paneles **E-G**, resultados experimentales del laboratorio.

Al graficar la voltametría cíclica de los datos obtenidos (Fig. 13G), se observa que tanto el pico de oxidación como los dos picos de reducción coinciden con la figura 13D en el voltaje al que aparecen. El pico de oxidación se muestra en ambos casos cercano a +0.5 V, mientras que el primero pico de reducción aparece a los 0 V y el segundo pico aproximadamente a los -0.75 V. Los resultados son similares en la forma de los picos de oxidación y reducción. Los voltajes a los que éstos aparecen coinciden tanto en la voltametría como la voltametría cíclica reportada por Sakmann (Sakmann y Neher, 2009). Sin embargo, los resultados muestran una amplitud de corriente aproximadamente 100 veces mayor a lo ya reportado. Ésta diferencia de amplitud se muestra, tanto en condiciones control como en presencia de serotonina 1 mM. El trazo de corriente en condiciones control es la respuesta de la fibra al protocolo aplicado (Figura 13A), lo que sugiere que la diferencia en las amplitudes de corriente es probablemente debida a las características de las fibras utilizadas. El grupo de Sakmann no reporta el diámetro de la fibra utilizada en sus experimentos; en el presente trabajo el diámetro de la fibra fue de 10 μM .

La voltametría es una técnica cuya aplicación es principalmente en experimentos *in vivo*. En el trabajo de Davidson y Stamford en 1997 se reporta una voltametría de serotonina medida en cerebro de rata; dicha voltametría se adquiere con un protocolo similar al utilizado en este trabajo. Los voltajes a los que aparecen los picos de oxidación y reducción, coinciden con los resultados mostrados en este trabajo; aunque como es de esperarse los picos son de menor amplitud debido a la concentración de serotonina a nivel fisiológico. Por otro lado, la amplitud de corriente de la fibra que reportan es mayor en comparación a la reportada en este trabajo de tesis utilizando fibras de carbono de 8 μM de diámetro. Asimismo, en otro estudio *in vivo* (Michael y col., 1999) se reporta una voltametría de serotonina medidas en cerebro de ratón. Los resultados de esta publicación son semejantes a los resultados del presente trabajo en forma y voltajes de aparición de los picos de oxidación y reducción. La amplitud de corriente de la fibra de carbono es similar a la reportada por Sakmann, utilizando fibras de 5 μM de diámetro (Michael y col., 1999; Sakmann y Neher, 2009).

Las moléculas tienen puntos de oxidación y reducción a voltajes específicos, por lo que la coincidencia de los resultados de este trabajo de tesis con la literatura es prueba de la estandarización de la voltametría. Por otro lado, la amplitud de corriente de las fibras de

carbono depende de diversas características de éstas como lo son: el diámetro, la orientación y los grupos funcionales que se encuentren en la superficie (Figura 8) (McCreery, 1995; Sakmann y Neher, 2009).

El diámetro de las fibras puede variar entre los 5 – 35 μm , lo cual se ha sugerido que repercute en la corriente basal de la fibra; pues a mayor superficie existe un mayor número de grupos funcionales disponibles para reaccionar (McCreery, 1991). Se ha propuesto que los grupos funcionales varían entre las fibras de carbono, por lo que no se conocen exhaustivamente cuales grupos existen en ellas. Sin embargo, es bien sabido que algunos procedimientos pueden ayudar a incrementar dichos grupos en la superficie de la fibra, como lo son baños en propanol. Por lo anterior, se puede incrementar la corriente basal de la fibra independientemente del diámetro que posea. De igual forma, la orientación con la que se construye la fibra se considera que puede afectar su conductividad; esto aún no ha sido comprobado (McCreery, 1995; Sakmann y Neher 2009).

Al existir diversos diámetros, grupos funcionales y orientaciones en las fibras de carbono es posible explicar porque tan amplia variabilidad en la corriente basal de las fibras entre los diversos trabajos publicados. Sin embargo, esto no afecta los resultados ni la utilidad de esta metodología debido a que el análisis se realiza de los picos de reacción, los cuales resultan de la resta de la corriente de reacción menos la corriente basal. Para la implementación de esta técnica se recomienda estandarizar y trabajar con un solo grupo de fibras (McCreery, 1995; Sakmann y Neher, 2009). Por lo anterior, la estandarización de las técnicas electroquímicas quedaron implementadas en el laboratorio, por ello se prosiguió a la modificación de los electrodos para el registro de insulina.

Modificación De Electrodos Con Cloruro De Rutenio

Una vez implementado el registro de serotonina por voltametría, fue necesario realizar una modificación a los electrodos de fibra de carbono para proseguir al registro y posterior análisis de insulina. La modificación de electrodos de fibra de carbono para la oxidación de insulina con compuestos de rutenio ya ha sido descrita (Cox y Gray, 1990; Huang y col., 1995; Kennedy y col., 1993). Se ha reportado que la modificación de los electrodos con compuestos de rutenio favorece el registro de insulina con la técnica de amperometría. Sin embargo, los registros de voltametría no son viables con estos electrodos (Kennedy y col., 1993).

El incremento en la corriente basal de la fibra de carbono es un parámetro utilizado para determinar si el cloruro de rutenio se adsorbe en la superficie de la fibra (Gorski y col., 1997). En el trabajo antes citado, se sugiere que la formación de capas incrementa la conductividad del electrodo; cuantas más capas de compuesto de rutenio se formen, habrá un mayor incremento en la corriente del electrodo. La adsorción del cloruro de rutenio llega a su máxima adsorción a los 15 minutos, como se puede ver en la figura 14B.

En el presente trabajo los electrodos conducen inicialmente una corriente aproximada de 100 nA. Al aplicar el protocolo de ciclado se observa un cambio de corriente que finaliza en aproximadamente 900 nA. En la figura 14C se muestra una voltametría cíclica antes de aplicar el protocolo (línea gris) y una vez finalizado el mismo (línea negra). Los resultados en cuanto al incremento de la corriente son variables. Previo a su uso, los electrodos se secan por un mínimo de 2 h a temperatura ambiente. Después del secado, los electrodos deben conservar un incremento de corriente mayor a 600 nA para ser utilizados en la detección amperométrica de insulina; como se muestra en la voltametría de la figura 14D. De lo contrario los electrodos se descartan, pues se ha observado que los que presentan un aumento de corriente menor no son capaces de oxidar insulina.

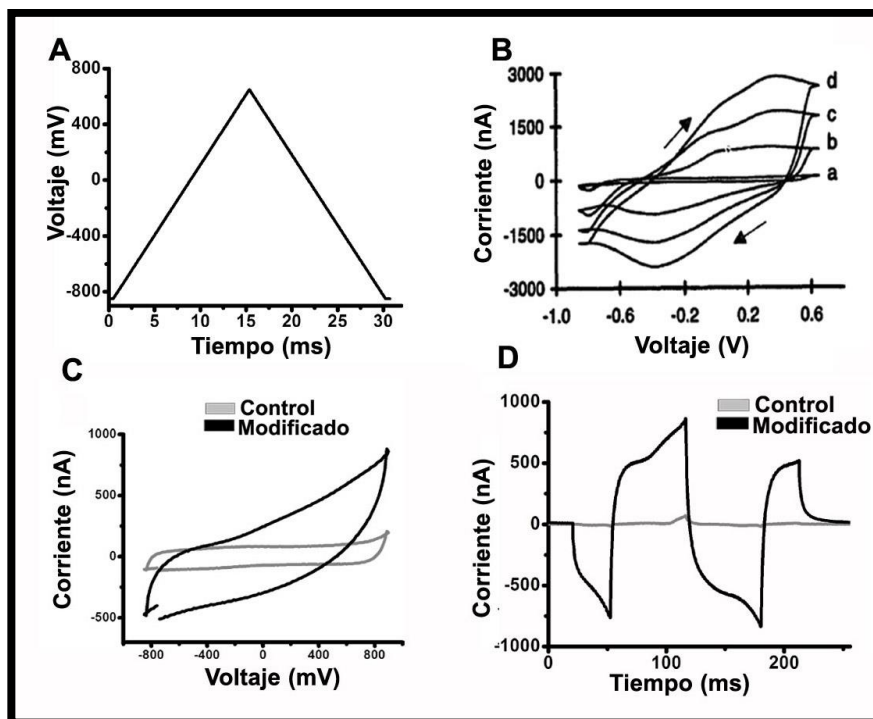


Figura 14. Modificación de electrodos con cloruro de rutenio. A. Protocolo de ciclado para promover la adsorción de cloruro de rutenio en la fibra de carbono. **B y C.** Voltametrías cíclicas

de la modificación de electrodos; el incremento de la corriente fue registrado en **B.** a los (a) 20 s, (b) 5 min, (c) 10 min, (d) 15 min y **C.** a los 0 s (línea gris) y 15 min (línea negra). **D.** Voltametría de un electrodo previo a su modificación (línea gris) y después de su modificación y secado por 2 h a temperatura ambiente (línea negra). (Panel **B** modificado de Gorski y col., 1997).

Se ha sugerido que la insulina a un pulso de +0.65 V sufre una reducción en sus puentes de disulfuro, dando lugar a grupos tiol. Estos grupos al ser muy reactivos reaccionan con la fibra de carbono y se adsorben en su superficie de manera irreversible. Se ha propuesto que los compuestos de rutenio favorecen una transferencia de oxígeno a los grupos tiol promoviendo su oxidación (Cox y Gray, 1990). Es por ello que una modificación de los electrodos con estos compuestos favorezca la oxidación de insulina (Gorski y col., 1997; Wang y col., 2007). La adsorción del cloruro de rutenio a la fibra de carbono incrementa la corriente basal del electrodo en proporción al número de capas que se forman; las cuales repercuten directamente en capacidad del electrodo para oxidar de insulina y su estabilidad en registros prolongados (Gorski y col., 1997). En este trabajo se observó que un incremento de por lo menos 600 nA por encima de la corriente basal, es un parámetro crítico para predecir que la modificación promoverá la oxidación de insulina.

Registro Amperométrico Hidrodinámico De Insulina

Después de la modificación de los electrodos se utiliza un pulso sostenido de +0.65 V que promueve la oxidación de insulina como se ha reportado por otros grupos (Cox y Gray, 1989; Gorski y col., 1997; Huang y col., 1995).

En la figura 15 se muestra un registro representativo de la detección amperométrica de insulina. Primeramente, se realizó un registro bajo condiciones control utilizando solución Ringer (Fig. 15A). Bajo estas condiciones no se registra ninguna espiga. Posteriormente, se registra la corriente en respuesta a la inyección de insulina 1 mM (Fig. 15B), como puede observarse en presencia de insulina se obtienen espigas. Es necesario aislar las espigas para un posterior análisis (Fig. 15C). En promedio la corriente máxima (I_{max}) de las espigas registradas es de 9.67 ± 1.99 nA ($n=15$).

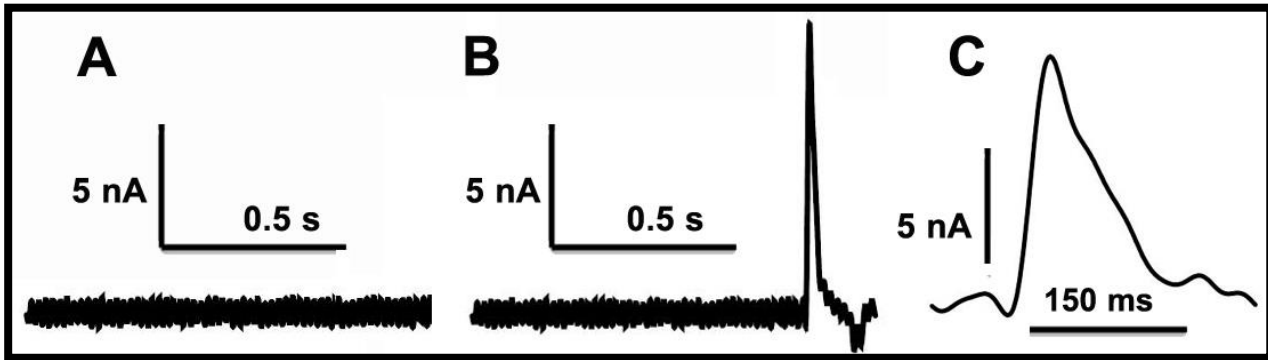


Figura 15. Registro amperométrico de una espiga representativa de insulina. A. Registro de corriente en condiciones control. **B.** Registro de corriente al inyectar insulina 1 mM; en estas condiciones se registra una espiga de corriente. **C.** Aislamiento de la espiga representativa.

En la literatura se utilizan concentraciones menores a 1 mM para comprobar la modificación de los electrodos, el grupo de Gorski utilizando 95 μ M registra espigas de 1130 pA (Gorski y col., 1997). Las espigas amperométricas de insulina deben ser proporcionales a la concentración utilizada; por lo que al convertir de nA a pA, se observa que los registros obtenidos en este trabajo están en una proporción de 1:10 con lo ya reportado. Esto sugiere que la modificación de electrodos y el registro de insulina se implementaron exitosamente.

Identificación De Células Beta En Cultivo Primario De Páncreas

El estudio de las células beta pancreáticas, como ya se ha mencionado a lo largo de este trabajo, ha sido relevante debido a la acción fisiológica de la insulina; por lo que es de gran interés estudiar todos los aspectos de su liberación. Sin embargo, primeramente hay que contar con un cultivo celular apropiado que permita realizar dichos estudios.

Una vez implementado el registro amperométrico de insulina, se procedió a estandarizar el cultivo primario de células beta pancreáticas de rata. Esto para poder realizar mediciones directas de la liberación de insulina en células únicas; por motivos que se explicarán más adelante, en este trabajo no se realizó la medición directa de insulina en células. El protocolo que se utilizó para estandarizar el cultivo es el reportado por el grupo de Hiriart (Velasco y col., 2012).

Se ha comprobado, que la metodología utilizada para el cultivo de células beta aísla en su mayoría células beta a partir de islotes de Langerhans (Hiriart y Matteson, 1988; Velasco y col., 2012); aunque hay evidencia de otros tipos celulares en el cultivo. Es por ello, que se requiere de evidencia experimental para distinguir a estas células de las poblaciones del cultivo. Para la identificación de células beta se utilizaron parámetros como la capacitancia de membrana, el registro de corrientes de calcio de VDCC y la farmacología para el estudio de canales de calcio relacionados con la liberación de insulina (Hiriart y Matteson, 1988; Satin y Cook, 1988; Taylor y col., 2005; Velasco y col., 2012).

Es bien sabido que la capacitancia de la membrana es un parámetro que se ha relacionado directamente con el tamaño celular (Hille, 2001). Por esta razón, se utiliza este parámetro para identificar a las células beta; en la literatura, se reportan capacitancias de 9 ± 3 pF para éstas (Navarro-Tableros y col., 2007; Velasco y col., 2012). Como se muestra en la figura 16A, las células que predominan en estos cultivos tienen una capacitancia de 8 ± 2 pF (n=36); éstas magnitudes coinciden con lo reportado para células beta, de acuerdo a la literatura (Navarro-Tableros y col., 2007; Velasco y col., 2012). Los experimentos siguientes se registran en esta población, pero se incrementó el intervalo de capacitancias a 9 ± 3 pF.

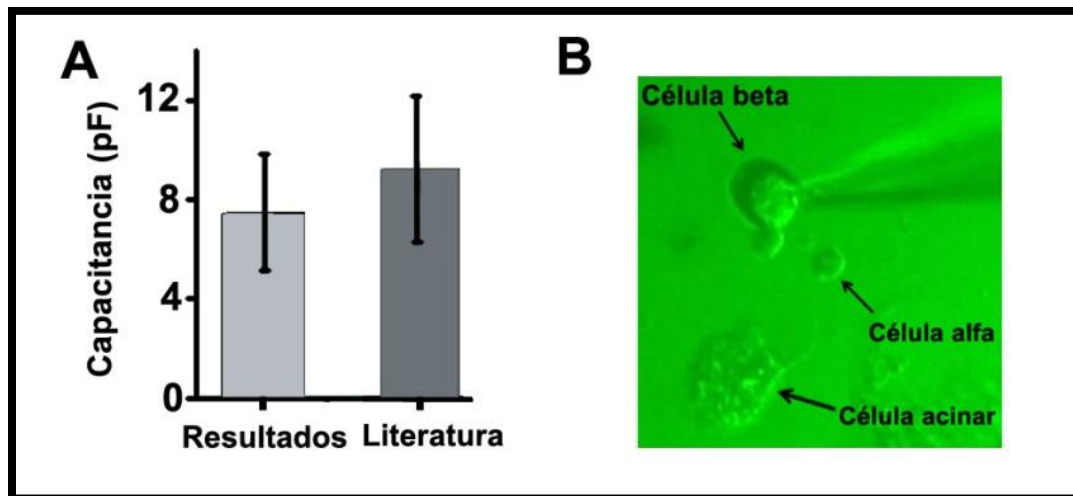


Figura 16. Clasificación de células beta pancreáticas por capacitancia en cultivo. A. Promedio de capacitancias de las células beta; obtenidas en el laboratorio y en la literatura. **B.** Fotografía de las tres poblaciones del cultivo celular primario de islotes pancreáticos de rata.

Se ha descrito que las células alfa tienen una capacitancia aproximada de 5 pF, y que en cultivos es el segundo tipo celular más abundante (Huang y col., 2013; In't Veld y Marichal, 2010). Asimismo, se ha reportado otra población dentro del cultivo con una capacitancia aproximada de 30 pF. Esta población tiene como característica principal un extenso daño en su membrana; debido a que son células que reciben un doble tratamiento enzimático es posible que estas células sean acinares. Por lo anterior, es probablemente que las tres poblaciones observadas en estos cultivos sean células beta, células alfa y células acinares (Fig. 16B).

Corrientes de Calcio en Células Beta Pancreáticas

Identificando a las células por su capacitancia y con el fin de contar con mayor evidencia de que la población está conformada por células beta, se prosiguió a estudiar mediante la técnica de Patch-Clamp (configuración en célula completa) las corrientes de calcio de dichas células. Esto por la relevancia que la entrada de calcio tiene en la liberación de insulina (Ammälä y col., 1993; Hiriart y Matteson, 1988). Para medir las corrientes de calcio se utilizó bario como acarreador de carga, ya que es más permeable que el calcio en estos canales, lo que permite un mejor registro de las corrientes (Hiriart y Aguilar-Bryan, 2008).

Los VDCC se dividen en dos clases: Los canales LVA y canales HVA (Lacinova, 2005). Se ha sugerido que los canales que proveen la mayor fuente de calcio para la liberación de insulina son los canales HVA tipo L (Bokvist y col., 1995; Hiriart y Aguilar-Bryan, 2008; Sher y col., 2003; Taylor y col., 2005).

La capacitancia de las células registradas en el presente trabajo (n=36) se encuentra entre 9 ± 3 pF (Fig. 17A). El registro de las corrientes de calcio muestra amplitudes heterogéneas que pueden ser agrupadas en tres grupos. El primer grupo muestra una amplitud de corriente de 31 ± 2.13 nA (n=23), el segundo grupo presenta una amplitud de 71 ± 2.73 nA (n=9), mientras que el tercer grupo muestra una amplitud de 140 ± 10.78 nA (n=3) (Fig. 17A-17B). Sin embargo, las amplitudes de corrientes de calcio reportadas en la literatura son de aproximadamente 80 pA (Navarro-Tableros y col., 2007; Satin y Cook, 1988; Velasco y col., 2012).

En 1988 el grupo de Hiriart publicó un trabajo pionero en el estudio de las células beta pancreáticas (Hiriart y Matteson, 1988). En dicho estudio se realizaron ensayos en placa hemolítica inversa para la identificación de células pancreáticas secretoras de insulina; en el

ensayo observaron que los halos de inhibición alrededor de las células que secretaron insulina variaban en diámetro. El objetivo del trabajo era estudiar los canales de calcio y sodio en estas células, al registrar canales de calcio observaron que las corrientes variaban entre 10-350 pA. La entrada de calcio a la célula beta pancreática, ya se había sugerido era relevante para la liberación de insulina (Satin y Cook, 1985). Al existir una variación tan amplia en las corrientes y en la liberación de insulina, se concluyó que las células beta pancreáticas son una población heterogénea.

El trabajo publicado por el grupo de Hiriart en 1988 apoya la variabilidad en las corrientes registradas en este trabajo de tesis. Sin embargo, la mayoría de las publicaciones existentes reportan en células beta pancreáticas amplitudes de aproximadamente 80 pA (Navarro-Tableros y col., 2007; Satin y Cook, 1988; Taylor y col., 2005). De los grupos registrados en este trabajo, las corrientes del grupo 2 son catalogadas como células beta pancreática pues en promedio se registran amplitudes de ~71 pA.

Por otro lado, estudios en páncreas de ratas neonatas han reportado amplitudes de corrientes de calcio de aproximadamente 30 pA (Navarro-Tableros y col., 2007) que coinciden con las registradas en el grupo 1 del presente trabajo de tesis. Los autores sugieren que estas corrientes predominan en neonatos debido a que las células beta son aún inmaduras, por lo que no se favorece una mayor entrada de la corriente de calcio en las células, y por lo tanto una menor liberación de insulina. Esto cambia con la edad, ya que la proporción de canales de calcio se modifica y la corriente entrante de calcio se incrementa. Sin embargo, se ha reportado que en cultivos de células neonatales y adultas de origen humano no existe una diferencia en la población de canales de calcio presentes en la célula (Fox y col., 2013). Aunque, sí hay diferencia en la secreción de insulina; en dicho artículo se sugiere que esta diferencia está dada a un nivel de secreción relacionado con una baja producción de la hormona, o bien con una baja capacidad de secreción por ausencia de proteínas que participan en la fusión de las vesículas con la membrana. Estos datos apoyan la probabilidad de que las corrientes registradas en este trabajo de tesis clasificadas como grupo 1 pertenezcan a células beta pancreáticas.

En otros trabajos se han reportado amplitudes de corrientes semejantes a las registradas en esta tesis vinculadas a una condición patológica, denominada Síndrome Metabólico (Larqué y col., 2011; Velasco y col., 2012). En el artículo de Velasco de 2012 trabajan con un modelo de síndrome metabólico en rata; en este modelo las células beta pancreáticas de animales controles muestran amplitudes de 80-90 pA, mientras que en las células de animales con síndrome metabólico se observa que el 50% de ellas registran

amplitudes de 30-50 pA, el 35% muestra amplitudes mayores a 100 pA y en el 15% de las células no se registra corriente. Ellos sugieren que amplitudes menores a 50 pA se relacionan con el agotamiento celular y amplitudes mayores a 100 pA a la hiperinsulinemia, padecimientos previos al establecimiento de la diabetes tipo 2; por lo que no se presentan en los controles.

Con lo anterior, las corrientes registradas en el grupo 2 del presente trabajo concuerdan con lo reportado en la literatura. Sin embargo, no es posible descartar que las corrientes que medidas en los grupos 1 y 3 sean de células beta. La implicación de que existan diferencias en las amplitudes de las corrientes que están estrechamente relacionadas con la liberación de insulina indicaría que este tipo celular es heterogéneo. Para confirmar que las corrientes son registradas en células beta es necesaria mayor evidencia experimental, ya que la capacitancia y el registro de sus corrientes son insuficientes hasta el momento para definirlo. Esto se discutirá más adelante en las perspectivas de este trabajo de tesis.

Sí bien las amplitudes de las corrientes de calcio son heterogéneas, la cinética de la corriente es similar en todos los casos, como se muestra en la figura 17B. Debido a la gran familia de canales de calcio existentes, y buscando una posible explicación a la heterogeneidad de las corrientes; se realizan curvas I-V para evaluar el comportamiento de los canales a diversos pulsos de voltaje. Se muestran las curvas de los dos grupos que se registran con mayor frecuencia en la figura 17C, donde se observa un comportamiento similar en ambos casos. Además, a voltajes cercanos a -30 mV se forma un hombro el cual se ha relacionado la presencia de canales de la clase LVA.

El análisis de la curva I-V sugiere que en las células registradas se encuentran canales tanto de la clase LVA como HVA. Para discernir lo anterior, se realiza un análisis de las colas de corriente de los grupos 1 y 2; las colas de corriente son picos que se registran cuando el protocolo termina y el voltaje pasa de -10 mV a -80 mV. Para dicho análisis, se toman las amplitudes máximas de las colas de corriente a diferentes voltajes y se grafican como puntos experimentales con respecto al voltaje. Posteriormente, a los datos se les ajusta una función Boltzmann doble, como se muestra en la figura 17D. De esta manera, es posible separar dos poblaciones: la población 1, en rojo, se abre a voltajes cercanos a -30 mV lo cual coincide con lo reportado para canales LVA y la población 2, en azul, se activa a voltajes cercanos a -10 mV, los cuales han sido reportados como canales HVA.

Los datos sugieren que dentro de las células beta podemos encontrar una amplitud de corrientes de calcio heterogéneas. Asimismo, la población de VDCC en estas células está conformada por dos poblaciones, una perteneciente a los canales de calcio LVA y otra a los canales de calcio HVA.

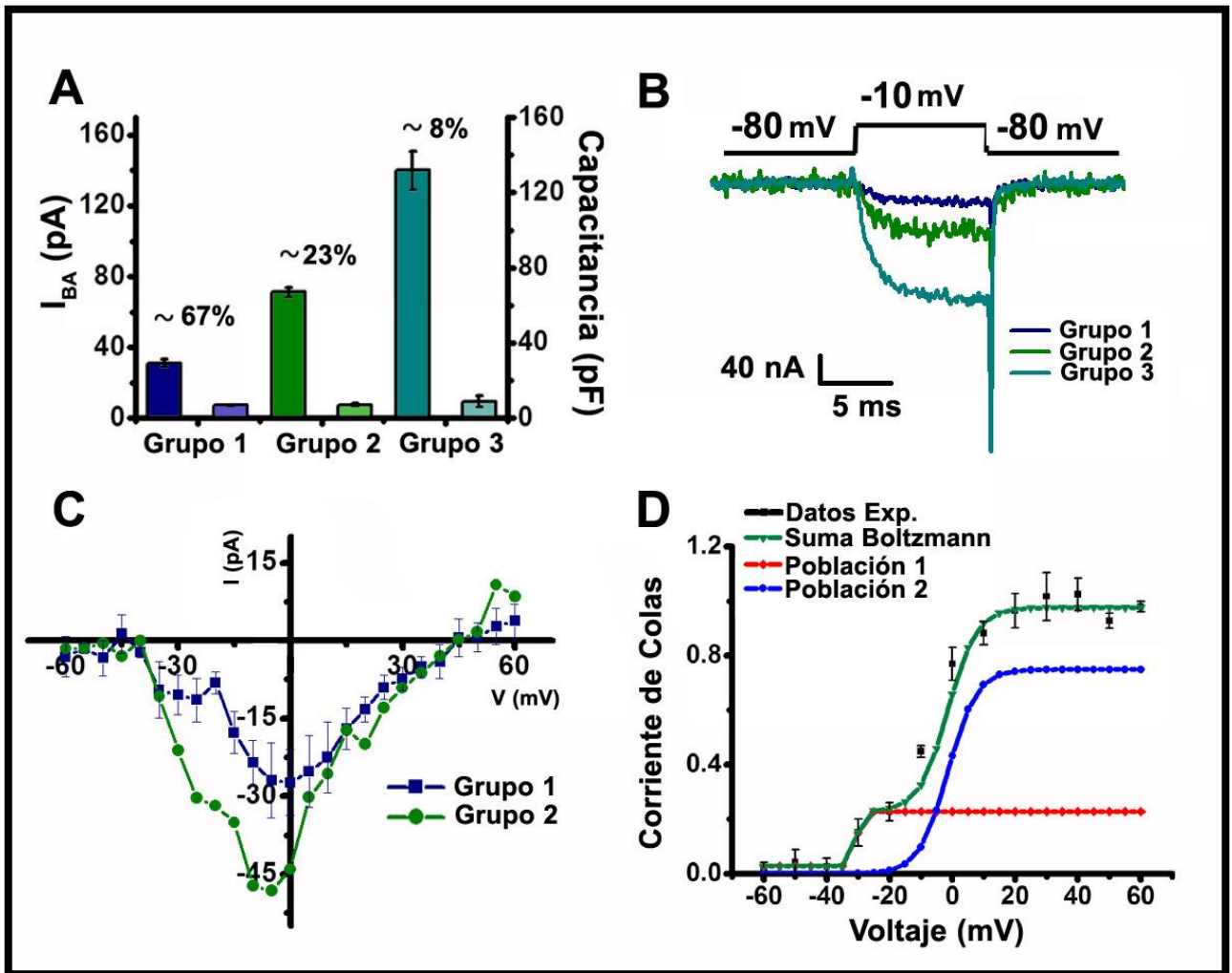


Figura 17. Análisis de las corrientes de calcio en las células beta pancreáticas. **A.** Las células tienen capacitancias entre 6 y 12 pF. Las corrientes de calcio se dividen en 3 grupos con diferente amplitud de corriente. **B.** Trazos representativos de corrientes de calcio de cada grupo. **C.** Curva I-V de los dos grupos que se registran con mayor frecuencia. **D.** Ajuste experimental a una función Boltzmann doble de la amplitud máxima de las colas de corriente.

Varios trabajos sugieren que la familia HVA se expresa en células beta pancreáticas de manera predominante. Sin embargo, no es la única familia y es posible también encontrar canales de la familia LVA (Ashcroft y col., 1990; Hiriart y Matteson, 1988; Sala y Matteson, 1990; Taylor y col., 2005), lo cual coincide con los resultados observados en este trabajo. También, se ha sugerido que los canales LVA están relacionados, aunque en menor medida, a la liberación de insulina. Hay evidencia que sugiere que, la ausencia o bloqueo de los canales T

pertenecientes a la familia LVA afecta la liberación de insulina en células beta pancreáticas (Sher y col., 2003). Esto implica una regulación de la liberación más estrecha, que no sólo está dada por canales HVA.

Aunado a todo lo anterior, también es relevante conocer la capacitancia celular de las otras poblaciones presentes en el cultivo celular. Esto para contar la información adecuada y descartar registros en las otras poblaciones. Se registró la capacitancia de todas las poblaciones presentes en el cultivo celular, como se puede observar en la figura 18. La capacitancia de las células beta dentro del grupo 1 es de 7.2 ± 0.49 pF (n=23), en el grupo 2 es de 7.46 ± 0.75 pF (n=9), mientras que en el grupo 3 es de 9.4 ± 3.16 pF (n=3). En las células que se consideran alfa, la capacitancia mide 3.73 ± 0.17 pF (n=4). Por otro lado, las células que se consideran acinares tienen una capacitancia de 30 pF (n=1).

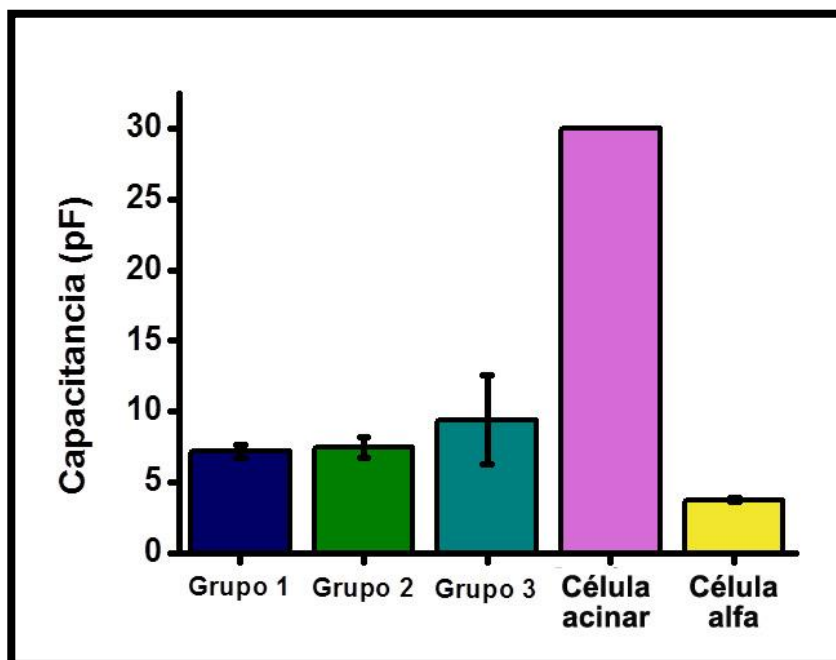


Figura 18. Capacitancia de las poblaciones celulares presentes en el cultivo.

Los grupos 1, 2 y 3 se consideran células beta; su capacitancia se registra de 6-12 pF. Las células acinares tienen capacitancias de 30 pF, mientras que las células alfa tienen capacitancias menores a 5 pF.

Debido a los datos experimentales obtenidos en relación a la electrofisiología de las células beta se decidió acotar este trabajo de tesis y enfocarlo a la farmacología de los canales

de calcio sensibles a voltaje; esto antes de proseguir al estudio de la liberación en tiempo real de insulina en estas células. El estudio de la farmacología de los VDCC es relevante para elucidar parte de los componentes esenciales en la liberación de las vesículas de insulina. En la literatura se ha descrito que los canales de la clase HVA tipo L aportan la mayor entrada de calcio en las células beta (Velasco y col., 2012; Taylor y col., 2005).

Farmacología de las corrientes de calcio

El estudio farmacológico de los canales de calcio se basa en probar fármacos, los cuales ya han sido comprobados que afectan o modulan la funcionalidad del canal. Esto permite estudiar las propiedades particulares de los canales.

Se sabe que el 100% de los VDCC son bloqueados por 100 μ M cadmio, por lo que resulta de gran ayuda utilizar a éste ión para confirmar que las corrientes registradas de calcio sean a través de canales sensibles a voltaje. Aunado a lo anterior, se ha reportado que las dihidropiridinas (1,4-DPH) como la nifedipina (Lacinova, 2005; Shen y col., 2000), inhiben específicamente a los VDCC tipo L. Este fármaco inhibe aproximadamente el 40% de la corriente de calcio en células beta (Taylor y col., 2005). Las corrientes de calcio se evalúan mediante Patch-Clamp aplicando nifedipina y cadmio. El resumen de la evaluación farmacológica se puede observar en la figura 19.

En la figura 19A se muestran los tres grupos de corrientes, clasificados de acuerdo a su amplitud y el porcentaje de inhibición que presentan con la aplicación de nifedipina y cadmio. Como se puede observar, al aplicar nifedipina el grupo 1 se ve afectado en un ~34% de su corriente (n=9), mientras que el grupo 2 muestra un ~49% de inhibición (n=4) y el grupo 3 muestra ~21% (n=1). Por otro lado, en la misma figura, se puede observar que la aplicación de cadmio inhibe el ~90% de la corriente de calcio en el grupo 1 (n=19) y el grupo 3 (n=2), mientras que en el grupo 2 inhibe ~85% (n=2). En las figuras 19B, C y D se muestra una corriente representativa de los tres grupos en condiciones control (trazo gris claro), con aplicación de nifedipina (trazo gris oscuro) y cadmio (trazo negro; sólo se muestra este dato para la Fig. 19B). A los datos se le ajusta una exponencial para analizar la inhibición en presencia del fármaco.

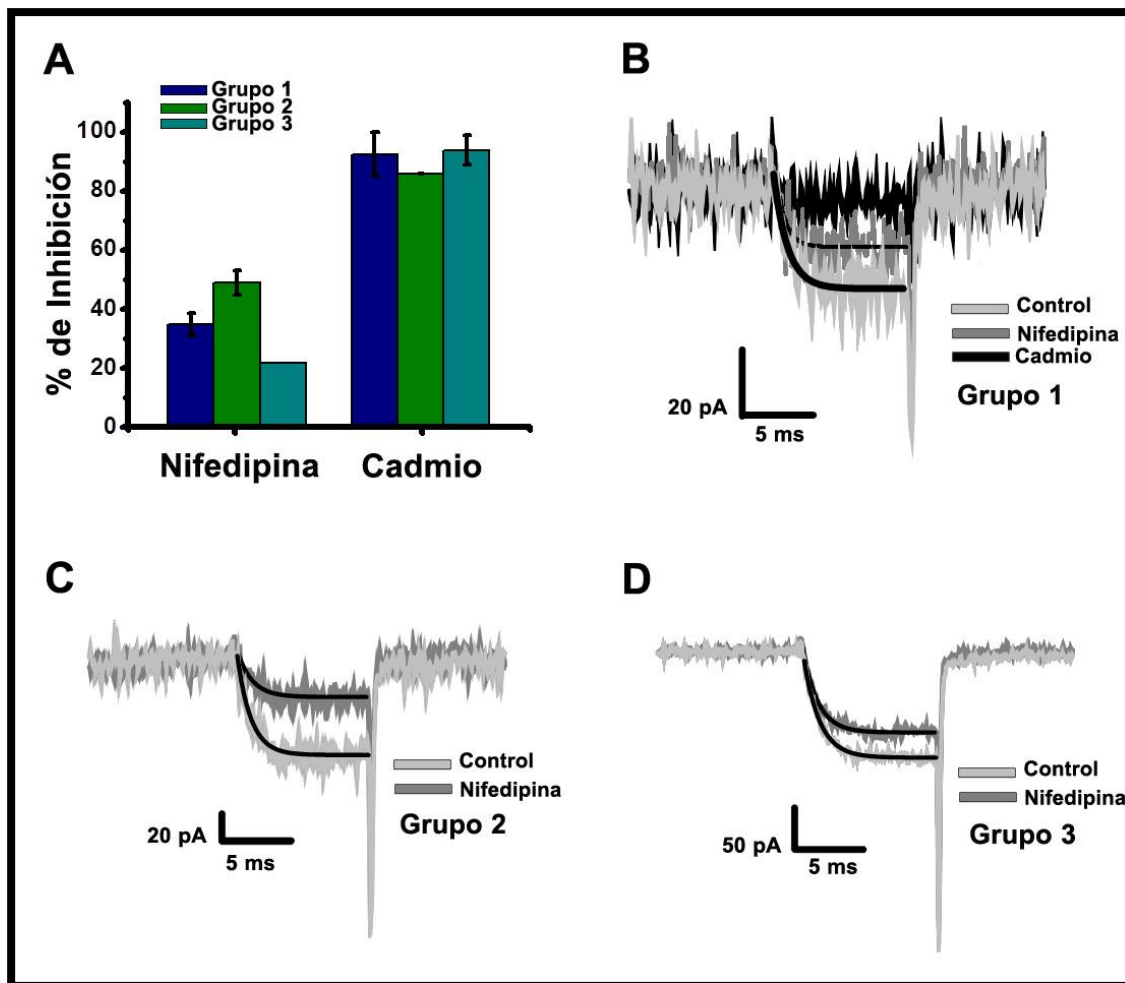


Figura 19. Efecto de la nifedipina y el cadmio sobre las corrientes de calcio. A. Se muestra el porcentaje de inhibición de los tres grupos de corrientes en presencia de nifedipina y cadmio. **B, C, D.** Trazo representativo de cada grupo en condiciones control y en presencia de nifedipina; se ajusta una exponencial, en negro, a los trazos. (Sólo se muestra la inhibición de cadmio en el panel **B**).

Al realizar estudios farmacológicos de las corrientes de calcio se observa que los grupos 1 y 2 son inhibidos en un porcentaje similar al reportado en la literatura (Navarro-Tableros y col., 2007; Taylor y col., 2005). Aunado a los estudios anteriores, estos resultados sugieren que las células clasificadas en el grupo 2 son células beta. El estudio del grupo 3 no es concluyente debido a que sólo se registró una célula perteneciente a este grupo. Además del estudio farmacológico con dihidropiridinas, el cadmio se utiliza para confirmar que las corrientes registradas sean de calcio. Los resultados muestran una inhibición en más del 85% de la

corriente en todos los grupos; esto indica que el 85% de la corriente son de calcio de VDCC. Se desconoce el origen del resto de la corriente, sin embargo no afecta el análisis de los datos (Yaari y col., 1987).

La identificación de las células pancreáticas en base a los datos reportados en la literatura como los son: la capacitancia de membrana, las corrientes de calcio y la farmacología, resultó inconclusa hasta el momento. Esto debido a que, en el cultivo células con capacitancias similares mostraron corrientes heterogéneas, las cuales se dividieron en grupos. De estos grupos, el grupo 2 concuerda con la literatura como célula beta pancreática. Esta área es nueva en el laboratorio por lo que resta aún trabajo experimental para confirmar si los grupos 1 y 3 son células beta; esto se discutirá en perspectivas.

CONCLUSIONES

- Se implementó exitosamente el método de voltametría hidrodinámica y cíclica.
- Se aportó un método para el análisis cinético de la liberación de insulina mediante electrodos modificados con cloruro de rutenio.
- Se documentó que las células beta pancreáticas de rata tienen una variedad de canales de calcio sensibles a voltaje.
- Se contribuyó en el conocimiento de los mecanismos previos a la liberación de insulina.

PERSPECTIVAS

Como se mencionó en este trabajo de tesis, el estudio de la liberación de insulina es de gran interés debido a la relevancia de dicha hormona a nivel fisiológico, lo que será de gran utilidad para una mejor comprensión de trastornos graves como la diabetes y el síndrome metabólico, así como para elaborar mejores estrategias de prevención.

Este trabajo es un avance en el estudio de la liberación de insulina en tiempo real mediante el uso de amperometría. Dados los resultados de esta tesis, su continuidad es el ensayo inmunohistoquímico que permita confirmar sí las células con capacitancia de 9 ± 3 pF, independientemente de la amplitud de corriente de calcio que se registre en ellas, son células beta pancreáticas.

En este caso, la técnica inmunohistoquímica consiste en utilizar biocitina al 1% en la solución interna utilizada en los registros de Patch-Clamp. Al finalizar el registro de corrientes de calcio se fijarán con paraformaldehído las células marcadas con biocitina. Después se realizará un doble marcaje; esto permitirá identificar la célula registrada y si ésta es positiva a insulina. Esta confirmación permitirá usar confiablemente el parámetro de capacitancia para la identificación de células secretoras de insulina.

El análisis amperométrico determinará la cinética de liberación de insulina a fin de elucidar los procesos involucrados en ella con la aplicación de estimulantes como glucosa e incretinas, las cuales son hormonas intestinales (GIP y GLP-1), con receptores específicos en las células beta pancreáticas, que incrementan la liberación de insulina. Una vez analizadas las células provenientes de animales en condiciones fisiológicas, se procederá al estudio en condiciones alteradas de síndrome metabólico y diabetes.

Por otra parte, este trabajo de tesis permite también extender el estudio de los canales de calcio en las células beta pancreática mediante farmacología específica. En los canales HVA se incluyen los canales tipo L, N, P/Q, mientras que en el caso de los canales LVA, el canal tipo T. Este complemento es necesario para entender cómo se afecta el proceso previo de liberación de insulina en trastornos fisiopatológicos.

BIBLIOGRAFIA

- Ammälä, C., Eliasson, L., Bokvist, K., Larsson, O., Ashcroft, F., Rorsman, P. 1993. Exocytosis Elicited By Action Potentials And Voltage-Clamp Calcium Currents In Individual Mouse Pancreatic B-Cells. *The Journal Of Physiology*, 472, 665-688.
- Ashcroft, F. M., Kelly, R. P., Smith, P. A. 1990. Two Types Of Ca Channel In Rat Pancreatic Beta-Cells. *Pflugers Archiv, European Journal Of Physiology*, 415, 504-6.
- Bokvist, K., Eliasson, L., Ammälä, C., Renström, E., Rorsman, P. 1995. Co-Localization Of L-Type Ca²⁺ Channels And Insulin-Containing Secretory Granules And Its Significance For The Initiation Of Exocytosis In Mouse Pancreatic B-Cells. *The EMBO Journal*, 14, 50.
- Boron, W. F., Boulpaep, E. L. 2009a. The Endocrine Pancreas. In: Elsevier, S. (Ed.) *Medical Physiology*. Second International Edition Ed.
- Boron, W. F., Boulpaep, E. L. 2009b. Pancreatic And Salivary Glands. In: Elsevier, S. (Ed.) *Medical Physiology*. Second International Edition Ed.
- Cox, J. A., Gray, T. J. 1989. Flow Injection Amperometric Determination Of Insulin Based Upon Its Oxidation At A Modified Electrode. *Analytical Chemistry*, 61, 2462-2464.
- Cox, J. A., Gray, T. J. 1990. Controlled-Potential Electrolysis Of Bulk Solutions At A Modified Electrode: Application To Oxidations Of Cysteine, Cystine, Methionine, And Thiocyanate. *Analytical Chemistry*, 62, 2742-2744.
- Creutzfeldt, W. 1979. The Incretin Concept Today. *Diabetologia*, 16, 75-85.
- Davidson, C., Stamford, J. A. 1997. Serotonin Efflux In The Rat Ventral Lateral Geniculate Nucleus Assessed By Fast Cyclic Voltammetry Is Modulated By 5-Ht1b And 5-Ht1d Autoreceptors. *Neuropharmacology*, 35, 1627-1634.
- Facultad De Medicina, UNAM [Internet]. *Atlas Digital De Histología* [Online] Departamento De Biología Celular Y Tisular, Facultad De Medicina, UNAM, Ciudad De México. Citado: Abril, 2014. Disponible: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/atlas2013a/>
- Fox, J. E. M., Seeberger, K., Dai, X. Q., Lyon, J., Spigelman, A. F., Kolic, J., Hajmrle, C., Joseph, J. W., Kin, T., Shapiro, A. J. 2013. Functional Plasticity Of The Human Infant B-Cell Exocytotic Phenotype. *Endocrinology*, 154, 1392-1399.
- Giugliano, D., Ceriello, A., Esposito, K. 2008. Glucose Metabolism And Hyperglycemia. *The American Journal Of Clinical Nutrition*, 87, 217s-222s.

- Gorski, W., Aspinwall, C. A., Lakey, J. R. T., Kennedy, R. T. 1997. Ruthenium Catalyst For Amperometric Determination Of Insulin At Physiological Ph. *Journal Of Electroanalytical Chemistry*, 425, 191-199.
- Hamill, O., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F. 1981. Improved Patch-Clamp Techniques For High-Resolution Current Recording From Cells And Cell-Free Membrane Patches. *Pflügers Archiv, European Journal Of Physiology*. 391, 85-100.
- Heien, M., Ewing, A. 2009. Quantitative Chemical Analysis Of Single Cells. In: Foote, R. S., Lee, J. W. (Eds.) *Micro And Nano Technologies In Bioanalysis*. Humana Press.
- Hille, B. 2001. *Ionic Channels Of Excitable Membranes*, Sinauer Associates, Incorporated.
- Hiriart, M., Aguilar-Bryan, L. 2008. Channel Regulation Of Glucose Sensing In The Pancreatic B-Cell. *American Journal Of Physiology - Endocrinology And Metabolism*, 295, E1298-E1306.
- Hiriart, M., Matteson, D. 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, 617-639.
- Huang, L., Shen, H., Atkinson, M. A., Kennedy, R. T. 1995. Detection Of Exocytosis At Individual Pancreatic Beta Cells By Amperometry At A Chemically Modified Microelectrode. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 92, 9608-9612.
- Huang, Y.-C., Rupnik, M. S., Karimian, N., Herrera, P. L., Gilon, P., Feng, Z.-P., Gaisano, H. Y. 2013. *In Situ* Electrophysiological Examination Of Pancreatic A Cells In The Streptozotocin-Induced Diabetes Model, Revealing The Cellular Basis Of Glucagon Hypersecretion. *Diabetes*, 62, 519-530.
- In't Veld, P., Marichal, M. 2010. Microscopic Anatomy Of The Human Islet Of Langerhans. In: Islam, M. S. (Ed.) *The Islets Of Langerhans*. Springer Netherlands.
- Kennedy, R. T., Huang, L., Atkinson, M. A., Dush, P. 1993. Amperometric Monitoring Of Chemical Secretions From Individual Pancreatic Beta-Cells. *Analytical Chemistry*, 65, 1882-7.
- Koh, D.-S., Hille, B. 1999. Rapid Fabrication Of Plastic-Insulated Carbon-Fiber Electrodes For Micro-Amperometry. *Journal Of Neuroscience Methods*, 88, 83-91.
- Koh, D.-S. 2006. Carbon Fiber Amperometry In The Study Of Ion Channels And Secretion. In: Stockand, J., Shapiro, M. (Eds.) *Ion Channels*. Humana Press.
- Lacinova, L. 2005. Voltage-Dependent Calcium Channels. *General Physiology And Biophysics*, 24.

- Larqué, C., Velasco, M., Navarro - Tableros, V., Duhne, M., Aguirre, J., Gutiérrez - Reyes, G., Moreno, J., Robles - Diaz, G., Hong, E., Hiriart, M. 2011. Early Endocrine And Molecular Changes In Metabolic Syndrome Models. *IUBMB Life*, 63, 831-839.
- Madsbad, S., Kehlet, H., Hilsted, J., Tronier, B. 1983. Discrepancy Between Plasma C-Peptide And Insulin Response To Oral And Intravenous Glucose. *Diabetes*, 32, 436-438.
- McCreery, R. L. 1991. Carbon Electrodes: Structural Effects On Electron Transfer Kinetics. *Electroanalytical Chemistry*, 17, 221-374.
- McCreery, R. L. 1995. *Voltammetric Methods In Brain Systems*: Chapter 1 Carbon Electrode Surface Chemistry. 27, 1-26.
- Mears, D. 2004. Regulation Of Insulin Secretion In Islets Of Langerhans By Ca^{2+} Channels. *The Journal Of Membrane Biology*, 200, 57-66.
- Michael, D. J., Joseph, J. D., Kilpatrick, M. R., Travis, E. R., Wightman, R. M. 1999. Improving Data Acquisition For Fast-Scan Cyclic Voltammetry. *Analytical Chemistry*, 71, 3941-3947.
- Navarro-Tableros, V., Fiordelisio, T., Hernandez-Cruz, A., Hiriart, M. 2007. Nerve Growth Factor Promotes Development Of Glucose Induced Insulin Secretion In Rat Neonate Pancreatic Beta Cells By Modulating Calcium Channels. *Channels*, 1, 408-416.
- Netter, F. H., Drake, R. L., Vogl, A. W. 2010. *Atlas Of Human Anatomy/ Gray's Anatomy For Students*, Elsevier Science Health Science Division.
- NOM-062-ZOO-1999, 1999. Especificaciones Técnicas Para La Producción, Cuidado Y Uso De Los Animales De Laboratorio. *Secretaría De Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca Y Alimentación*.
- Olivares, R., Arellano, P. 2008. Bases Moleculares De Las Acciones De La Insulina. *Revista De Educación Bioquímica*, 27, 9-18.
- Polder, H., Weskamp, M., Linz, K., Meyer, R. 2005. Voltage-Clamp And Patch-Clamp Techniques. In: Dhein, S., Mohr, F., Delmar, M. (Eds.) *Practical Methods In Cardiovascular Research*. Springer Berlin Heidelberg.
- Sakmann, B., Neher, E. 2009. *Single-Channel Recording*, Springer Science + Business Media.
- Sala, S., Matteson, D. 1990. Single-Channel Recordings Of Two Types Of Calcium Channels In Rat Pancreatic Beta-Cells. *Biophysical Journal*, 58, 567-571.
- Satin, L. S., Cook, D. L. 1985. Voltage-Gated Ca^{2+} Current In Pancreatic B-Cells. *Pflugers Archiv, European Journal of Physiology*. 404, 385-7.

- Satin, L. S., Cook, D. L. 1988. Evidence For Two Calcium Currents In Insulin-Secreting Cells. *Pflügers Archiv, European Journal of Physiology*, 411, 401-409.
- Seino, S. 2012. Cell Signalling In Insulin Secretion: The Molecular Targets Of Atp, Camp And Sulfonylurea. *Diabetologia*, 55, 2096-2108.
- Shen, J.-B., Jiang, B., Pappano, A. J. 2000. Comparison Of L-Type Calcium Channel Blockade By Nifedipine And/Or Cadmium In Guinea Pig Ventricular Myocytes. *Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*, 294, 562-570.
- Sher, E., Giovannini, F., Codignola, A., Passafaro, M., Giorgi-Rossi, P., Volsen, S., Craig, P., Davalli, A., Carrera, P. 2003. Voltage-Operated Calcium Channel Heterogeneity In Pancreatic B Cells: Physiopathological Implications. *Journal Of Bioenergetics And Biomembranes*, 35, 687-696.
- Simpson, K., Parker, J., Plumer, J., Bloom, S. 2012. CCK, PYY And PP: The Control Of Energy Balance. In: Joost, H.-G. (Ed.) *Appetite Control*. Springer Berlin Heidelberg.
- Stingl, H. 2007. The Place Of Insulin Secretagogues In The Treatment Of Type 2 Diabetes In The Twenty-First Century. In: Mogensen, C. (Ed.) *Pharmacotherapy Of Diabetes: New Developments*. Springer Us.
- Straub, S. G., Sharp, G. W. G. 2002. Glucose-Stimulated Signaling Pathways In Biphasic Insulin Secretion. *Diabetes/Metabolism Research And Reviews*, 18, 451-463.
- Taylor, J. T., Huang, L., Keyser, B. M., Zhuang, H., Clarkson, C. W., Li, M. 2005. Role Of High-Voltage-Activated Calcium Channels In Glucose-Regulated B-Cell Calcium Homeostasis And Insulin Release. *American Journal Of Physiology, Endocrinology And Metabolism*, 289, E900-E908.
- Velasco, M., Larqué, C., Gutiérrez-Reyes, G., Arredondo, R., Sanchez-Soto, C., Hiriart, M. 2012. Metabolic Syndrome Induces Changes In K⁺ ATP-Channels And Calcium Currents In Pancreatic B-Cells. *Islets*, 4, 302-311.
- Wang, J., Tangkuaram, T., Loyprasert, S., Vazquez-Alvarez, T., Veerasai, W., Kanatharana, P., Thavarungkul, P. 2007. Electrocatalytic Detection Of Insulin At RuOx/Carbon Nanotube-Modified Carbon Electrodes. *Analytica Chimica Acta*, 581, 1-6.
- Winslow T., 2009. Anatomía Del Páncreas [Internet] *National Cancer Institute*, U.S.A. Government [Online]. Citado: Abril, 2014. Disponible: <http://www.cancer.gov/>
- Yaari, Y., Hamon, B., Lux, H. D. 1987. Development Of Two Types Of Calcium Channels In Cultured Mammalian Hippocampal Neurons. *Science*, 235, 680-682.

- Zawalich, W. S., Yamazaki, H., Zawalich, K. C. 2008. Biphasic Insulin Secretion From Freshly Isolated Or Cultured, Perfused Rodent Islets: Comparative Studies With Rats And Mice. *Metabolism*, 57, 30-39.
- Zhou, Z., Mislser, S. 1996. Amperometric Detection Of Quantal Secretion From Patch-Clamped Rat Pancreatic Beta-Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 270-7.
- Zhuang, H., Bhattacharjee, A., Hu, F., Zhang, M., Goswami, T., Wang, L., Wu, S., Berggren, P.-O., Li, M. 2000. Cloning Of A T-Type Ca^{2+} Channel Isoform In Insulin-Secreting Cells. *Diabetes*, 49, 59-64.