



Grado de Medicina

Efecto de la acetilcolina en la capacidad secretora de insulina de las células β del páncreas.

Autora: Marina Gómez Sierra.
Tutor: Dr. Juan Vicente Sánchez.
Departamento de Medicina.
Año 2018. Castellón.

ÍNDICE

Hoja de autorización del tutor.....	4
Índice de abreviaturas.....	5
Resumen.....	6
Abstract.....	7
Extended Summary.....	8
I.INTRODUCCIÓN.....	11
1.1 Aspectos generales e importancia de la regulación pancreática en la glucemia.....	12
1.2 Historia de la insulina e implicación nerviosa en su secreción.....	13
1.3 Control de la liberación de insulina por glucosa.....	14
1.3 Regulación colinérgica de la secreción de insulina	15
1.4. Hipótesis y objetivos.....	17
II. MATERIAL Y MÉTODOS.....	18
2.1 Procedimiento para la obtención de islotes.....	19
2.2 Procedimiento para la obtención de datos electrofisiológicos.....	19
2.3 Análisis de datos.....	20
III. RESULTADOS.....	21
3.1 Curva dosis respuesta de la glucosa.....	22
3.2 Efecto de carbacol sobre concentraciones subestimuladoras de glucosa...27	
3.3 Efecto de carbacol sobre concentraciones supraestimuladoras de glucosa.29	
3.4 Resultados estadísticos.....	34
IV. DISCUSIÓN.....	37
4.1 Discusión del método.....	37
4.1.1 Heterogeneidad de las células β	38
4.1.2 Diferencias entre islote humano y de roedor.....	39

4.2	Discusión de los resultados.....	40
4.2.1	Patrón de respuesta de la célula β a glucosa.....	40
4.2.2	Efecto de carbacol sobre glucosa subestimuladora	41
4.2.3	Efecto de carbacol sobre glucosa supraestimuladora.....	42
4.2.4	Entrada de calcio y liberación de insulina.....	44
4.2.5	Sistema parasimpático y obesidad.....	44
4.2.6	Posible uso clínico de agonistas muscarínicos en el tratamiento de la DM tipo 2.....	45
VI.	CONCLUSIONES.....	47
VII.	AGRADECIMIENTOS.....	49
VIII.	BIBLIOGRAFÍA.....	51



TRABAJO DE FIN DE GRADO (TFG)- MEDICINA

EL/LA PROFESOR/A TUTOR/A hace constar su **AUTORIZACIÓN** para la Defensa Pública del Trabajo de Fin de Grado y **CERTIFICA** que el/la estudiante lo ha desarrollado a lo largo de 6 créditos ECTS (150 horas)

TÍTULO del TFG: *efecto de la acetilcolina en la capacidad secretora de insulina de los células β del páncreas*

ALUMNO/A: *Marina Gómez Sierra*

DNI: *80069962-G*

PROFESOR/A TUTOR/A: *Juan Vicente Sánchez Arco*

Fdo (Tutor/a):

COTUTOR/A INTERNO/A (Sólo en casos en que el/la Tutor/a no sea profesor/a de la Titulación de Medicina):

Fdo (CoTutor/a interno):

Índice de abreviaturas.

AMPC: Adenosín monofosfato cíclico.

ATP: Adenosín trifosfato.

Cav: Canal de calcio dependiente de voltaje.

DM: Diabetes Mellitus.

Epac: Receptor intracelular de adenosín monofosfato cíclico.

GLUT2: Transportador de glucosa 2.

GPCRs: Receptores acoplados a proteína G.

IMC: Índice de masa corporal.

IR: Receptor de insulina.

KATP: Canal de potasio sensible a adenosín trifosfato.

Kv7: Canal de potasio dependiente de voltaje.

M1- M5: Receptores muscarínicos.

M3R: Receptor muscarínico de tipo M3.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PKA: Receptor intracelular de adenosín monofosfato cíclico.

Vm: Potencial de membrana.

Resumen.

El páncreas es una glándula vital para el control metabólico del organismo. Una de las funciones de éste órgano es la regulación de la glucemia, que es esencial para la función fisiológica saludable del cuerpo, debido a que tanto el exceso como el defecto de glucosa son perjudiciales para el organismo, produciendo enfermedades como la DM tipo 2, cada vez más prevalente en nuestro medio. El principal regulador de la secreción de insulina en las células β pancreáticas es la concentración de glucosa en sangre. Sin embargo se ha comprobado que el sistema nervioso autónomo podría contribuir en la potenciación de su secreción.

El sistema nervioso parasimpático inerva el páncreas endocrino ejerciendo su acción por medio de los receptores muscarínicos, activando una vía amplificadora mediada por un aumento de AMPc intracelular, que tiene como resultado, un aumento de la actividad eléctrica por aumento de la entrada de calcio intracelular.

Se ha estudiado la actividad eléctrica intracelular de las células β pancreáticas. Esta fue registrada en islotes de Langerhans, obtenidos mediante microdissección, de ratones albinos, sacrificados por dislocación cervical.

En éste trabajo se ha estudiado el comportamiento electrofisiológico de la célula β , y se ha demostrado que el carbacol tiene un efecto potenciador sobre la célula β .

Palabras clave: Acetilcolina, Insulina, Sistema colinérgico, Electrofisiología, células β .

Abstract.

Pancreas is a vital gland for the metabolic control of the organism. One of the functions of this organ is the regulation of glycemia, which is essential for the healthy physiological function of the body, because both the excess and the defect of glucose are harmful to the body, producing diseases such as DM type 2, increasingly prevalent in our environment. The main regulator of insulin secretion in pancreatic β cells is the concentration of glucose in the blood.

However, it has been proven that the autonomic nervous system, among others, can contribute to the enhancement of its secretion. The parasympathetic nervous system innervates the endocrine pancreas by exerting its action through the muscarinic receptors, activating an amplifying pathway mediated by an increase in intracellular cAMP, which results in the release of insulin.

The intracellular electrical activity of the pancreatic β cells has been studied. It was recorded in islets of Langerhans, obtained by microdissection, of albino mice, sacrificed by cervical dislocation.

In this work we have analyzed the electrophysiological behavior of the β cell, and it has been shown that carbachol has an enhancing effect on the β cell.

Key words: Acetylcholine, Insulin, Cholinergic system, Electrophysiology, β cells.

Extended summary.

Pancreas is a vital gland for the metabolic control of the organism. The main functions of the pancreas are to produce exocrine enzymes to aid digestion and endocrine hormones to regulate blood glucose. The endocrine portion is constituted by pancreatic islets or islets of Langerhans, which constitute only 1-2% of the pancreatic parenchyma. The islets of Langerhans are composed of cells α , β , δ , PP and ϵ that secrete glucagon, insulin, somatostatin, pancreatic polypeptide and ghrelin, respectively, although, the hormones relevant to the control of blood glucose are insulin, which stimulates the transport of glucose to cells and glucagon, which mobilizes glucose deposits into the blood.

Control of glycemia is essential for the healthy physiological function of the body, because both the excess and the defect of glucose are harmful to the organism.

The importance of the regulation of glycemia is based on many aspects, one of which is that the brain depends on glucose as its main source of energy, and the strict regulation of glucose metabolism is fundamental for brain physiology. One of the most relevant problems regarding dysfunction of the pancreas is the so-called diabetes mellitus (DM) type 2, whose prevalence has been increasing dangerously in recent decades. Data obtained from the World Health Organization (WHO), show that the number of adult diabetic patients worldwide in 2014 was 422 million, compared to 108 million in 1980, that is, four times more. This raises the problem of deregulation of pancreatic organ functions. This is composed of obesity, which in recent years has become a problem of real concern. It is known that the increase in the incidence of this disease in developed countries is due to a lifestyle characterized by low physical activity and incorrect eating habits. It seems that vagal dysregulation has a certain relationship with this disease.

Together, these data support what is known today, and is that the main regulator of insulin secretion in pancreatic β cells is the concentration of circulating plasma glucose. However, as the metabolic functions of this hormone have become better known, it has been proved that the autonomic nervous system, among others, can contribute to the potentiation of its secretion. The cholinergic system exerts its action through the release of a neurotransmitter, acetylcholine. In turn, acetylcholine exerts its action on the muscarinic receptors, which belong to the G-protein coupled receptors (GPCRs), that is, they produce their effects through several signal translation systems in the effector cells. There are five subtypes of cholinergic muscarinic receptors (M1-M5), although it has

been determined that the M3-muscarinic receptor (M3R) is the main acetylcholine receptor responsible for enhancing the release of insulin-dependent glucose in β cells.

The objective of this work is to experiment and understand the electrophysiological properties of the β cells of the pancreatic islets, and thus to determine if acetylcholine, or in this case, an analogue of this such as carbamoyl choline (Carbacol), has an enhancer effect on insulin secretion.

According to the exposed elements, the binding of the muscarinic agents block a potassium channel, therefore, in the intracellular pancreatic β -cell recording, a depolarization should take place as a consequence. The intracellular electrical activity of the pancreatic β cells was recorded in islets of Langerhans, obtained by microdissection, of albino mice, sacrificed by cervical dislocation.

The islets were isolated from the pancreas with the help of a dissecting microscope. Once microdissected, the islets were transferred to a recording chamber. After being introduced into the chamber, the islets were immobilized by means of metal microneedles, by the exocrine portion, leaving the endocrine portion free to be able to stretch area already said and expose it to the electrode. A new islet was used for each experiment. The experiments were performed in a perfusion chamber of continuous flow, with a volume of 200 microliters, perfused with an approximate flow of one milliliter per minute. The chamber was thermostated, maintaining a temperature of approximately 36° Celsius \pm 1°. Pulled borosilicate electrodes were used from tubes with o.d., 2.0 mm; i.d., 1.0 mm (Sutter Instruments, Novato, CA, USA) with a Narishige PE2 puller (Narishige, Japan). The electrodes were filled with 3 M potassium citrate and 50 mM KCl.

For recording, an Axoprobe microelectrode amplifier was used (Axon Instruments, Foster City, CA, USA). The data was acquired at a frequency of 1 kHz using the Clampex software (v10.6, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) using an acquisition card (Digidata 1500, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). And stored on the computer's hard drive for further analysis using ClampFit (v10.6, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

The obtained data allow us to conclude the following:

1. Glucose has two types of action, substimulatory and suprastimulatory, with respect to the generation of oscillatory activity and extracellular calcium entry.
2. The action of carbachol on substimulatory glucose has no effect on the β cell. Therefore, it could be concluded that carbachol has no inducing effect.
3. The application of carbachol in the β cell in the presence of suprastimulatory glucose, gives rise to a response pattern, which can be described as a series of phases. 1st phase: Relatively durable depolarization, 2nd phase: Hyperpolarization, 3rd phase: Discharges to some extent similar to glucose but not necessarily having action potentials in its plateau, 4th phase: Continuous phase, 5th phase: Remaining effect.
4. The administration of a muscarinic agonist could represent a possible route for the treatment of type 2 DM, due to its potentiating effect on insulin release. However, it should be noted that the M3 muscarinic receptors are not only in the pancreas, and they play a key role in the mediation of smooth muscle contraction and in the activation action of most endocrine and exocrine glands. Therefore, the potential clinical use of agents that selectively promote signaling through M3R may be limited by peripheral side effects.

I. INTRODUCCIÓN.

1.1 Aspectos generales e importancia de la regulación pancreática en la glucemia.

El páncreas es una glándula vital para el control metabólico del organismo. Las principales funciones del páncreas son producir enzimas exocrinas para ayudar a la digestión y hormonas endocrinas para regular la glucosa en sangre. La porción exocrina del páncreas representa alrededor del 98% de su masa y está compuesta de células acinares responsables de la síntesis, el almacenamiento y la secreción de enzimas digestivas.¹ La porción endocrina está constituida por islotes pancreáticos o islotes de Langerhans, que constituyen únicamente un 1-2% del parénquima pancreático.²

Los islotes de Langerhans están compuestos por células α , β , δ , PP y ϵ que secretan glucagón, insulina, somatostatina, polipéptido pancreático y ghrelina, respectivamente, aunque, las hormonas relevantes para el control de la glucemia son la insulina, que estimula el transporte de glucosa hacia las células y el glucagón, el cual moviliza los depósitos de glucosa hacia la sangre.^{3,4} La insulina tiene efectos sobre el metabolismo, entre ellos, cabe destacar que disminuye la glucosa en sangre, ya que favorece la glucólisis, disminuye la lipólisis, reduce la cantidad de ácidos grasos libres circulantes y aumenta la síntesis de proteínas. Debido a estos procesos, se puede afirmar que es una hormona anabólica. Por otro lado, el glucagón es una hormona catabólica debido a que sus efectos sobre el metabolismo son aumentar la glucosa en sangre ya que aumenta la glucogenólisis y también tiene efectos sobre el metabolismo lipídico aumentando la β oxidación de ácidos grasos.⁵

El control de la glucemia, es esencial para la función fisiológica saludable del cuerpo, debido a que tanto el exceso como el defecto de glucosa, son perjudiciales para el organismo.²

La importancia de la regulación de la glucemia se basa en muchos aspectos, uno de ellos es que, el cerebro depende de la glucosa como su fuente principal de energía, y la regulación estricta del metabolismo de ésta, es fundamental para la fisiología cerebral. En consonancia con su papel fundamental para la función fisiológica del cerebro, la alteración del metabolismo normal de la glucosa, forma la base fisiopatológica de muchos trastornos cerebrales, como pueden ser la demencia vascular o la enfermedad de Alzheimer.⁶

Uno de los problemas mas relevantes con respecto a la disfunción del páncreas, es la denominada diabetes mellitus (DM) tipo 2, cuya prevalencia ha estado aumentando

peligrosamente en las últimas décadas.¹ Según la concepción clásica, la DM tipo 2 se caracteriza por sensibilidad reducida a la insulina, esto significa que las células y los órganos son menos sensibles a ésta. La DM tipo 2, también está asociada a una secreción incorrecta de insulina. A medida que se genera dicha resistencia, los islotes sufren una hiperplasia, paso con lo que se intenta compensa la hiperglucemia. En ocasiones, este intento de compensación puede producir una secreción excesiva de insulina, pudiendo llegar hasta generarse una hiperinsulinemia. Sin embargo, a medida que pasa el tiempo, éste proceso de compensación puede llegar a su límite, produciéndose la atrofia de las células β .⁷ Los datos obtenidos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), muestran que el número de pacientes diabéticos adultos en todo el mundo en el año 2014 era de 422 millones, frente a los 108 millones en 1980, es decir, unas cuatro veces más. Esto hace plantearse el problema que supone la desregulación de las funciones del órgano pancreático.⁸

Por otro lado, cabe mencionar la obesidad, que en los últimos años se ha convertido en un problema realmente preocupante. Se sabe que el aumento de la incidencia de ésta enfermedad en los países desarrollados, se debe a un estilo de vida caracterizado por baja actividad física y hábitos alimenticios incorrectos.⁹ Parece que la desregulación vagal, tiene cierta relación con ésta enfermedad. Por un lado, el nervio vago, induce la secreción de insulina y ésta, al ser una hormona anabólica, produce un almacenamiento de calorías que podrían dar respuesta al aumento de peso producido en ésta enfermedad ¹⁰. Por otro lado, el nervio vago, que inerva el intestino, comunica información periférica sobre el volumen y el tipo de nutrientes entre el intestino y el cerebro. Dependiendo del estado nutricional, las células enteroendocrinas del intestino liberan hormonas anoréxicas que inhiben la ingesta de alimentos u hormonas orexígenas que estimulan la ingesta de alimentos. Estas hormonas, son captadas por los quimiorreceptores que tiene el nervio vago en el intestino, respondiendo acorde al estímulo recibido. Una limitación en la señalización aferente vagal es suficiente para impulsar la hiperfagia y la obesidad. ¹¹

1.2 Historia de la insulina e implicación nerviosa en su secreción.

La insulina fue descubierta en el verano de 1921 por Sir Frederick Grant Banting como consecuencia de una serie de experimentos realizados junto con Best, un estudiante de química. En el año 1927, La Barré realizó una serie de experimentos, que le permitieron afirmar que la secreción de insulina en sangre por parte del páncreas, podía aumentar bajo la influencia de modificaciones nerviosas de origen vagal.¹²

Sin embargo, otros estudios realizados con posterioridad ensombrecieron la implicación nerviosa en la regulación endocrina del páncreas:

- En 1973 Kemp et al comprobaron que el páncreas trasplantado mantenía los niveles de glucosa en sangre. Por tanto determinó que la implicación nerviosa en la regulación pancreática no tenía ningún fundamento.¹³
- En 1979 Gagerman et al evidenció que la estimulación eléctrica de los nervios vagos inducía la secreción de insulina, pero la estimulación era de corta duración, provocando incrementos transitorios en la respuesta secreta y sin efecto sobre la glucemia.¹²

En contraposición a los estudios de Kemp y Gagerman, existe un concepto denominado fase cefálica de secreción de insulina, que consiste en que existe un primer pico de secreción de insulina, antes de que los nutrientes se digieran y la glucosa se incorpore al torrente sanguíneo.²

En conjunto, estos datos apoyan lo que se sabe hoy día, y es que, el principal regulador de la secreción de insulina en las células β pancreáticas es la concentración de glucosa en plasma circulante.³ Sin embargo a medida que se han ido conociendo mejor las funciones metabólicas de esta hormona, se ha comprobado que el sistema nervioso autónomo entre otros, pueden contribuir a la potenciación de su secreción.¹⁴

1.3 Control de la liberación de insulina por glucosa.

La hipótesis más aceptada es que, como ya se ha mencionado en el apartado anterior, el principal regulador de la secreción de insulina en las células β pancreáticas, es la concentración de glucosa en sangre. Las células β están muy vascularizadas, y por tanto, son capaces de detectar glucosa en rango fisiológicamente relevante.¹⁵

La glucosa ingresa en la célula β pancreática por medio de los receptores transportadores de glucosa (GLUT). Aunque se han identificado muchos transportadores GLUT (más de 10), es por medio de GLUT 2 como la glucosa ingresa dentro de la célula β pancreática.¹⁶ Una vez en el interior de la células β , la glucocinasa fosforila a la glucosa y la convierte en glucosa-6-fosfato.¹⁵ A continuación la glucosa-6-fosfato se oxida a adenosín trifosfato (ATP), de tal forma que la relación ATP/ADP aumenta, lo que conduce al cierre del canal de potasio sensible a ATP (K_{ATP}).¹⁶ El cierre

de estos canales de potasio despolariza a la membrana celular que conduce a la apertura de los canales de Calcio dependientes de voltaje (Cav).

El aumento de Ca^{2+} intracelular desencadena la exocitosis de las vesículas que contienen insulina.¹⁷

1.4 Regulación colinérgica de la secreción de insulina.

El sistema nervioso autónomo es esencial para la regulación de funciones fisiológicas críticas, que incluyen el gasto cardíaco, la temperatura corporal, los niveles de glucosa en sangre, etc.¹⁸ Clásicamente, el sistema nervioso autónomo se divide en dos ramas anatómica y funcionalmente distintas: el sistema nervioso simpático y el sistema nervioso parasimpático.¹⁹

Los sistemas simpático y parasimpático ejercen distintas acciones sobre los islotes pancreáticos: mientras que la estimulación simpática inhibe la secreción de insulina de las células pancreáticas β y promueve la secreción de glucagón a partir de células pancreáticas α , la actividad parasimpática estimula la secreción de insulina.¹⁸ Las fibras parasimpáticas que inervan el páncreas endocrino se originan principalmente en las neuronas de los ganglios intrapancreáticos, que reciben aportes preganglionares del rombencéfalo a través del nervio vago.¹⁸

El sistema colinérgico ejerce su acción por medio de la liberación de un neurotransmisor, acetilcolina.⁵ A su vez la acetilcolina, ejerce su acción en los receptores muscarínicos, que pertenecen a los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), es decir, que producen sus efectos a través de varios sistemas de traducción de señales en las células efectoras.²¹ Hay cinco subtipos de receptores muscarínicos colinérgicos (M1-M5), aunque se ha determinado que el receptor M3-muscarínico (M3R) es el principal receptor de acetilcolina responsable de potenciar la liberación de insulina dependiente de glucosa en células β .¹⁴

En el estudio de Nakajima, se quiso determinar la relevancia fisiológica de los receptores muscarínicos M3, analizando ratones mutantes que carecían de M3R selectivamente (solo en células pancreáticas β) y ratones transgénicos que sobreexpresaron M3R. Se determinó que, mientras los primeros mostraban intolerancia a la glucosa y reducían significativamente la liberación de insulina, los ratones transgénicos mostraron el fenotipo inverso (tolerancia a la glucosa muy mejorada y aumento de la secreción de insulina).²¹

En 1980, se demostró que la estimulación del páncreas con acetilcolina, bloqueaba una corriente, que se denominó M (muscarínico) dependientes de voltaje, que producía la despolarización de la membrana.²²

La composición molecular de los canales subyacentes de la corriente M fue un desafío durante casi 20 años, pero hoy en día se sabe que está producida por canales del tipo Kv7, es decir, una variedad de canales de potasio dependientes de voltaje. Esto quiere decir, que la acetilcolina produce el cierre de los canales Kv7 y produce, por tanto, la despolarización de la membrana de las células β pancreáticas. De ésta forma, cuando el sistema parasimpático se activa, éste, por medio de la acetilcolina, estimula a los receptores M3 del páncreas. La proteína G resultante de la activación de los receptores colinérgicos, bloquea a los receptores kv7, que se cierran, produciendo la despolarización de la membrana de la célula β pancreática. A la vez que se produce la despolarización, se retransmite la señal parasimpática, convirtiendo adenosín trifosfato (ATP) a adenosín monofosfato cíclico (AMPc).^{22,23}

Los efectos de AMPc están mediados por dos receptores de AMPc intracelulares expresados de forma ubicua, la proteína quinasa dependiente de cinasa A (PKA) y la proteína de intercambio, recientemente descubierta, directamente activada por nucleótido de guanina regulado por AMPc (Epac).²⁴

Una vez activados los receptores intracelulares de AMPc, es decir, PKA Y Epac, se genera mediante la movilización de Ca^{2+} desde las reservas intracelulares de Ca^{2+} del retículo endoplasmático²⁵, una potenciación de la secreción de insulina estimulada por glucosa, que da como resultado una exocitosis de insulina generada en la vía de amplificación.²

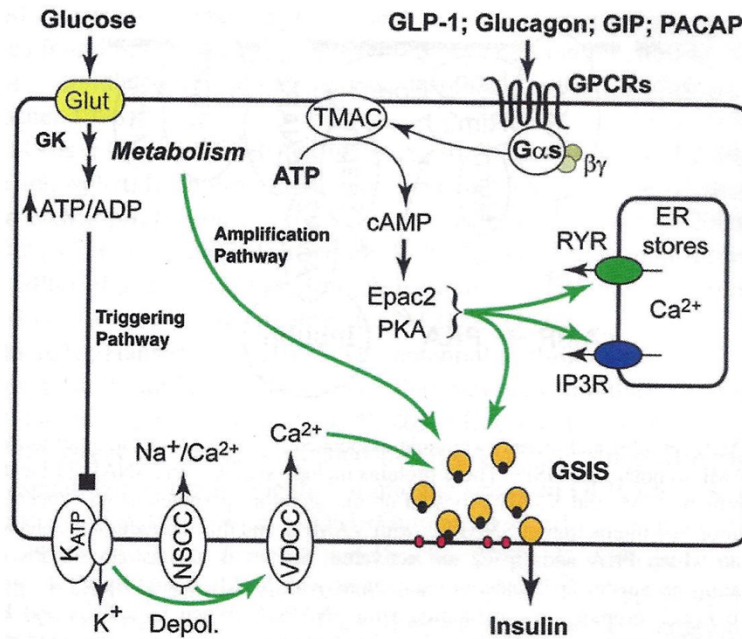


Figura 1: Vía de amplificación de la acetilcolina sobre las células pancreáticas.²

En la figura 1 se pueden identificar tanto la vía iniciadora a la izquierda y la vía amplificadora a la derecha. Se puede observar como los GPCR se activan por la acción de la acetilcolina, que produce una conversión de ATP en AMPc. A su vez, AMPc activa a Epac2 y PKA para potenciar la secreción de insulina estimulada por glucosa. La vía de activación por los GLUT da como resultado una exocitosis de insulina que, se potencia por la PKA y Epac2 generadas en la vía de amplificación. Obsérvese que la señal de Ca^{2+} (importante para la exocitosis) se genera mediante la entrada de Ca^{2+} mediante la movilización desde las reservas intracelulares de Ca^{2+} ubicadas en el retículo endoplasmático (ER).²

1.5 Hipótesis y objetivo.

Según los elementos expuestos, la unión de los agentes muscarínicos, podrían bloquear un canal de potasio, por consiguiente, en el registro intracelular de célula β pancreática, debería producirse, como consecuencia, una despolarización, sería por tanto, ésta nuestra hipótesis.

El objetivo general de este trabajo, consiste en experimentar y comprender las propiedades electrofisiológicas de las células β de los islotes pancreáticos. El objetivo específico consiste en determinar si la acetilcolina, o en éste caso, un análogo de ésta como es la carbamilo colina (Carbacol), tiene un efecto potenciador sobre la célula β pancreática.

II. MATERIAL Y MÉTODOS.

La actividad eléctrica intracelular de las células β pancreáticas, fue registrada en islotes de Langerhans, obtenidos mediante microdissección, de ratones albinos, sacrificados por dislocación cervical. El número de ratones empleados ha sido de 5.

El alojamiento de los animales y todos los procedimientos y protocolos fueron aprobados y de conformidad con las directrices institucionales de cuidado de los animales.

2.1 Procedimiento para la obtención de islotes.

Los islotes se aislaron del páncreas con ayuda de un microscopio de disección. Una vez microdisecados, los islotes se transfirieron a una cámara de registro. Tras ser introducidos en la cámara, los islotes se inmovilizaron por medio de microagujas de metal, por la porción exocrina, dejando la porción endocrina libre para poder así estirar dicha zona y exponerla al electrodo. Se utilizó un nuevo islote para cada experimentación. Los experimentos se realizaron en una cámara de perfusión de flujo continuo, con un volumen de 200 microlitros, perfundida con un flujo aproximado de un mililitro por minuto. La cámara estaba termostatazada, manteniendo una temperatura de aproximadamente 36° centígrados $\pm 1^{\circ}$.

La solución de Krebs modificada tenía la siguiente composición (mM): 120 NaCl, 25 NaHCO_3 , 5 KCl, 2,6 CaCl_2 y 1 MgCl_2 , y se equilibró con una mezcla de gases que contenía 95% O_2 -5% de CO_2 , obteniendo un pH de 7,4 a 36° C.

2.2 Procedimiento para la obtención de datos electrofisiológicos.

Se utilizaron electrodos de borosilicato estirados a partir de tubos con o.d., 2,0 mm; i.d., 1,0 mm (Sutter Instruments, Novato, CA, EE. UU.) con un estirador Narishige PE2 (Narishige, Japón). Los electrodos se llenaron con citrato de potasio 3 M y KCl 50 mM.

Para el registro, se utilizó un amplificador de microelectrodos Axoprobe (Axon Instruments, Foster City, CA, EE. UU.).

Los datos se adquirieron a muestreo de frecuencia de 1 kHz utilizando el software Clampex (v10.6, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EE. UU.) mediante una tarjeta de adquisición (Digidata 1500, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EE. UU.) y se almacenaron en el disco duro del ordenador para un análisis posterior utilizando

ClampFit (v10.6, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EE. UU.). Las células se empalaron en presencia de glucosa 10 mM para controlar el comportamiento oscilatorio característico de las células β pancreáticas. Los criterios mínimos de calidad fueron: al menos -40 mV de potencial de membrana en las fases silentes de las oscilaciones, 10 mV de despolarización a la fase activa y 10 mV de amplitud del potencial de acción. El criterio para la identificación como células β , fueron que al retirar la glucosa se detuvieron las oscilaciones y se produjo la hiperpolarización de la célula.

Con el fin de construir las respectivas curvas dosis-respuesta, se realizó un procedimiento consistente en exponer las células a glucosa 5 Mm, 7,5 Mm, 10 Mm, 15 Mm , 20 Mm y a la ausencia de glucosa.

Con objeto de explorar el efecto muscarínico, se añadió carbamoil colina (Carbacol) a diferentes concentraciones sobre glucosa 10 mM. El carbacol y los demás reactivos fueron adquiridos a Sigma.

2.3 Análisis de los datos.

Los datos han sido analizados mediante diferentes procedimientos: a) Porcentaje de tiempo en fase activa: Se mide el tiempo total de una oscilación completa, y el de la descarga asociada, determinando el porcentaje de tiempo de activa de dicha descarga sobre la oscilación total. b) Número de espigas por unidad de tiempo. c) Número de bursts.

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente por medio de la desviación estándar y T de student, considerándose significativa una $p < 0,05$.

III. RESULTADOS.

3.1 Curva dosis respuesta de la glucosa.

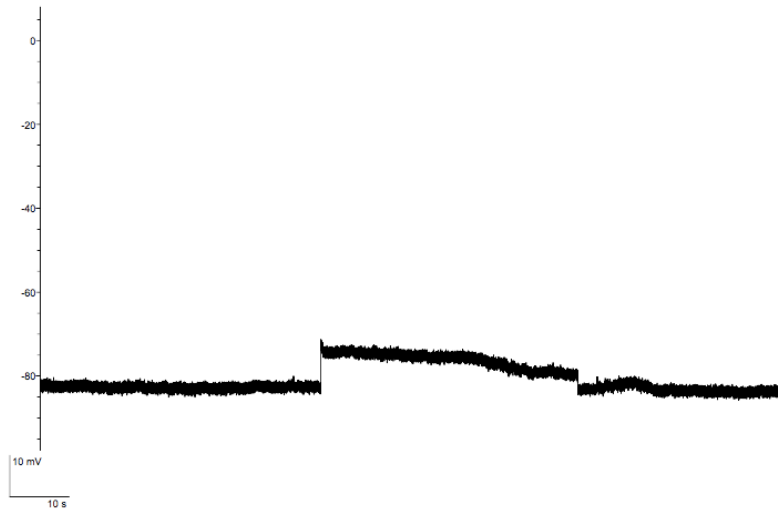


Figura 2: Célula β en ausencia de glucosa.

En la figura 2 se observa como en ausencia de glucosa, la célula β permanece en fase silente y con un potencial de membrana de unos -60 mV. El porcentaje de tiempo en fase activa es del 0%.

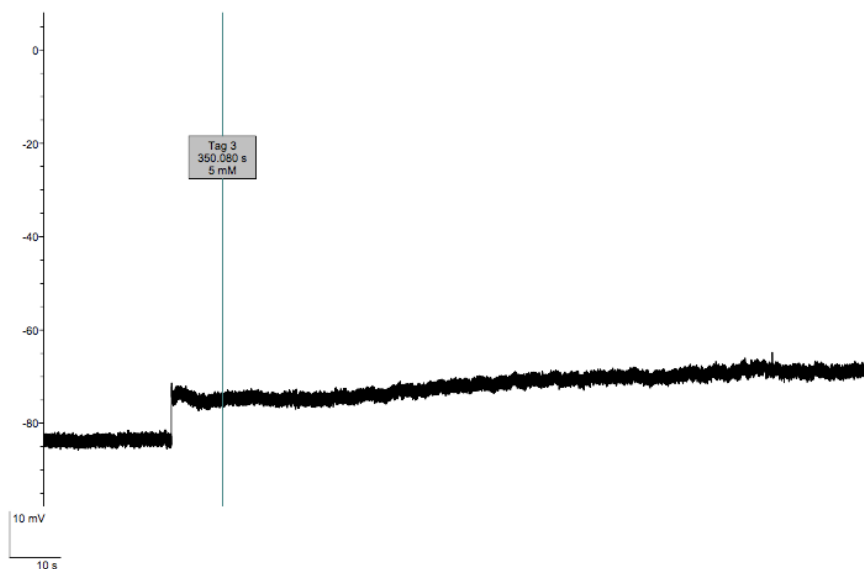


Figura 3: Célula β en un concentración 5 mM de glucosa.

La adición de glucosa 5 mM se traduce en que, el potencial de membrana asciende desde -60 mV a unos -45 mV. El porcentaje de tiempo en fase activa es del 0%.

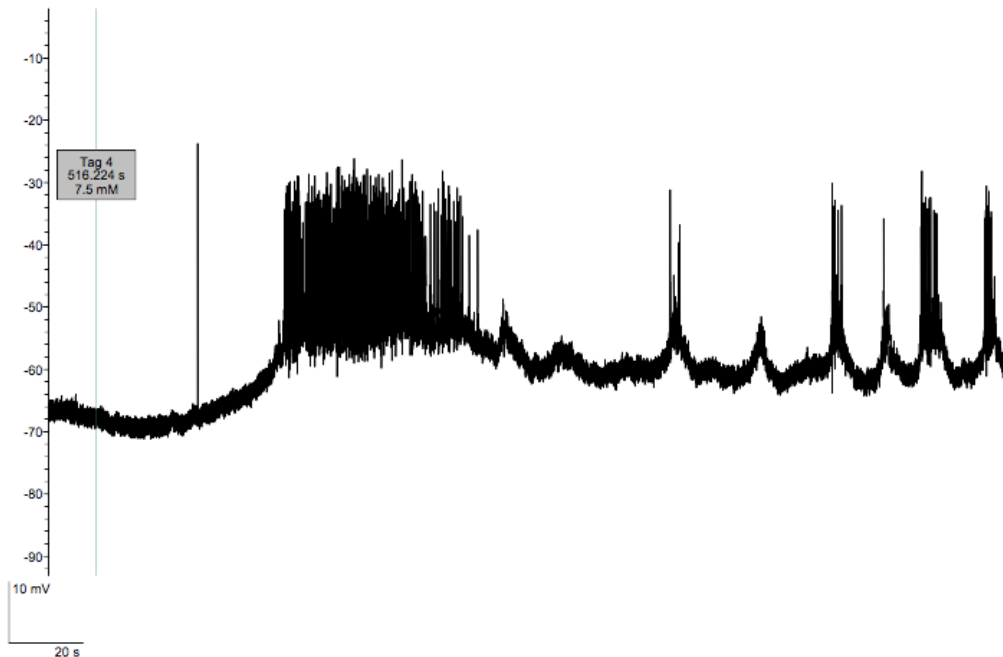


Figura 4: Célula β en medio con 7,5 mM de glucosa.

En la figura 4 se puede comprobar que, cuando en un islote perfundido con una solución en la que no hay glucosa, ni ningún agente iniciador o potenciador de la secreción, se cambia a una solución con glucosa 7,5 Mm, tiene lugar la aparición de una respuesta eléctrica típica que consiste en una sucesión regular de fases despolarizadas sobre las que se superponen descargas de espigas (fase activa) y de periodos en que la membrana repolariza (fases silentes). En esta misma figura se observa como el cambio de medio, produce una despolarización inicial que lleva el potencial de membrana desde -60 a -45 , y a continuación la instauración de la citada actividad rítmica que consiste en oscilaciones que conducen el potencial hasta unas mesetas sobre las que aparecen ráfagas de potenciales de acción. Tras la adición de glucosa 7,5 mM el porcentaje medio de tiempo en fase activa es de 27,96%.



Figura 5: Célula β en medio con 10 mM de glucosa.

En la figura 5 se observa que tras perfundir a la célula β con una concentración de glucosa de 10 mM se produce una descarga inicial continua de espigas, que tiene tendencia a disminuir en amplitud y frecuencia alcanzando un patrón estable que se mantienen en tanto se perfunde con este nivel de glucosa, y que se caracteriza por la generación continua de potenciales de acción seguidos de periodos silentes. El porcentaje medio en fase activa es del 55,87%.

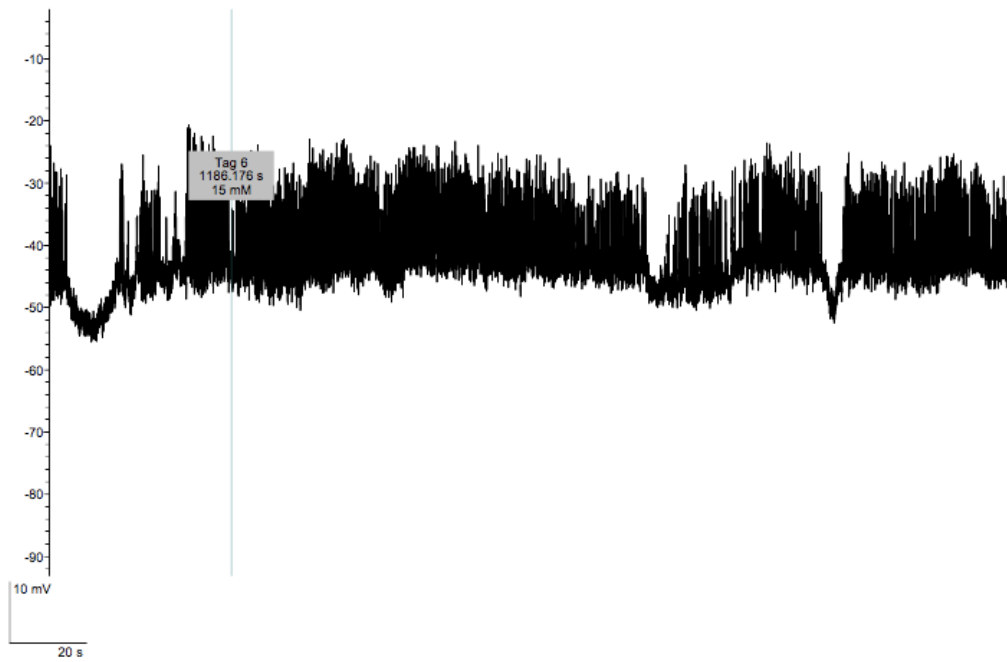


Figura 6: Célula β en medio con 15 mM de glucosa.

En la figura 6 se expone a la célula β a una concentración de 15 mM de glucosa. En esta figura se observa como aumenta la duración de las fases activas y disminuye la de las fases silentes. El porcentaje medio de tiempo en fase activa es del 98%.

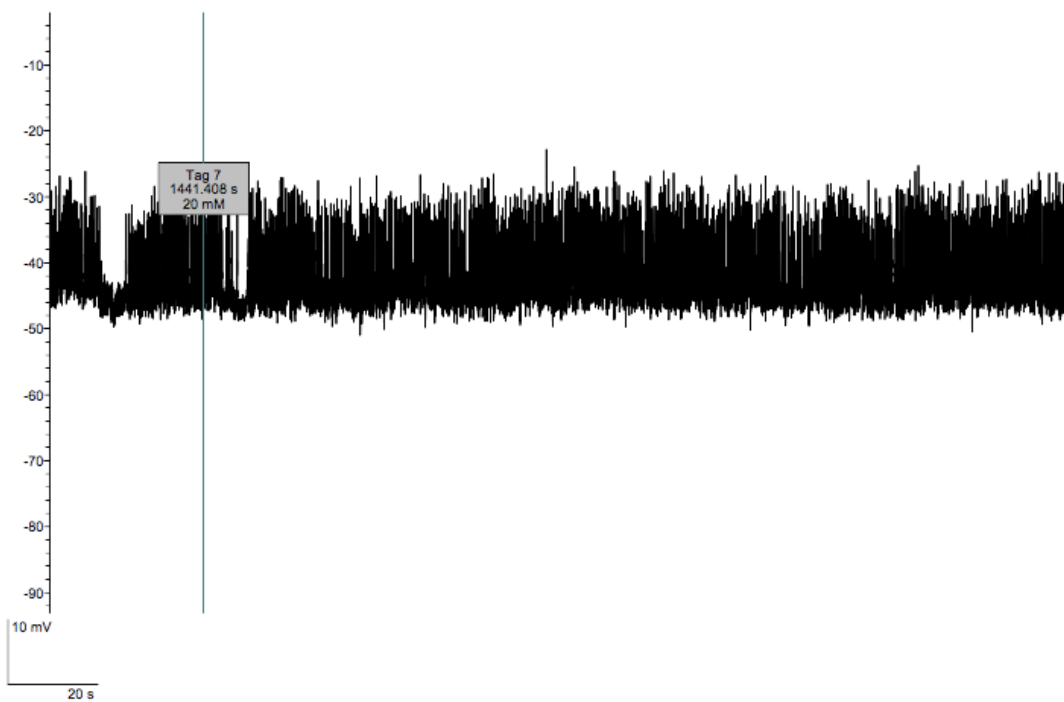


Figura 7: Célula β en medio con 20 mM de glucosa.

En la figura 7 en la que se incrementó la concentración de glucosa a 20 mM, se puede observar como la actividad es continua. El porcentaje de tiempo en fase activa es del 100%.

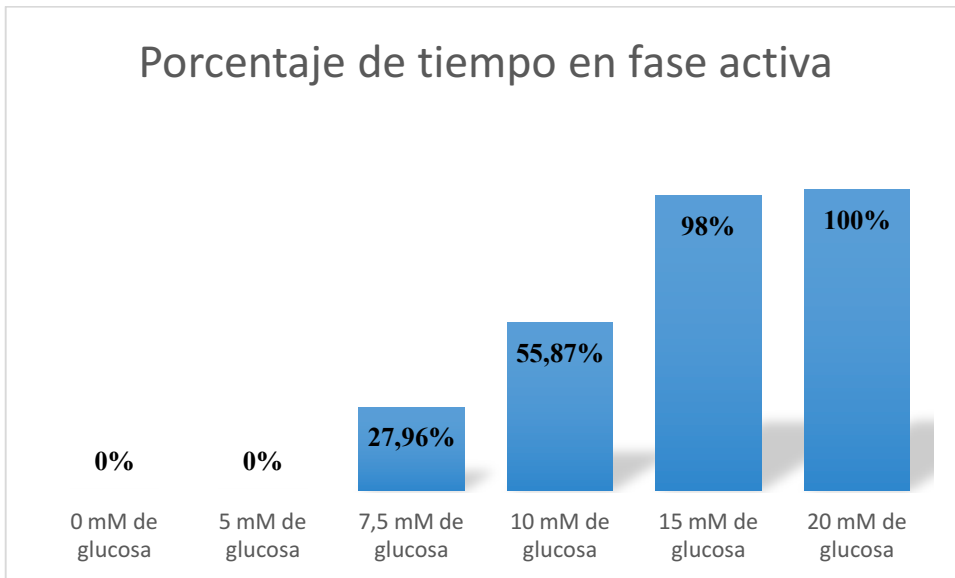


Figura 8: Gráfico resumen de el porcentaje de tiempo en fase activa de la célula β en diferentes concentraciones de glucosa.

Como se observa en la figura 8, la concentración de glucosa subestimularia, tiene un efecto nulo en la célula β . Las concentraciones supraestimuladoras van acrecentando el tiempo en fase activa a medida que aumenta la glucosa. Como consecuencia, se puede afirmar que el efecto de glucosa supraestimulador a medida que aumenta la concentración implica una prolongación de la duración de las fases activas a expensas de las silentes.

3.2 Efecto de carbacol sobre concentraciones subestimuladoras de glucosa.

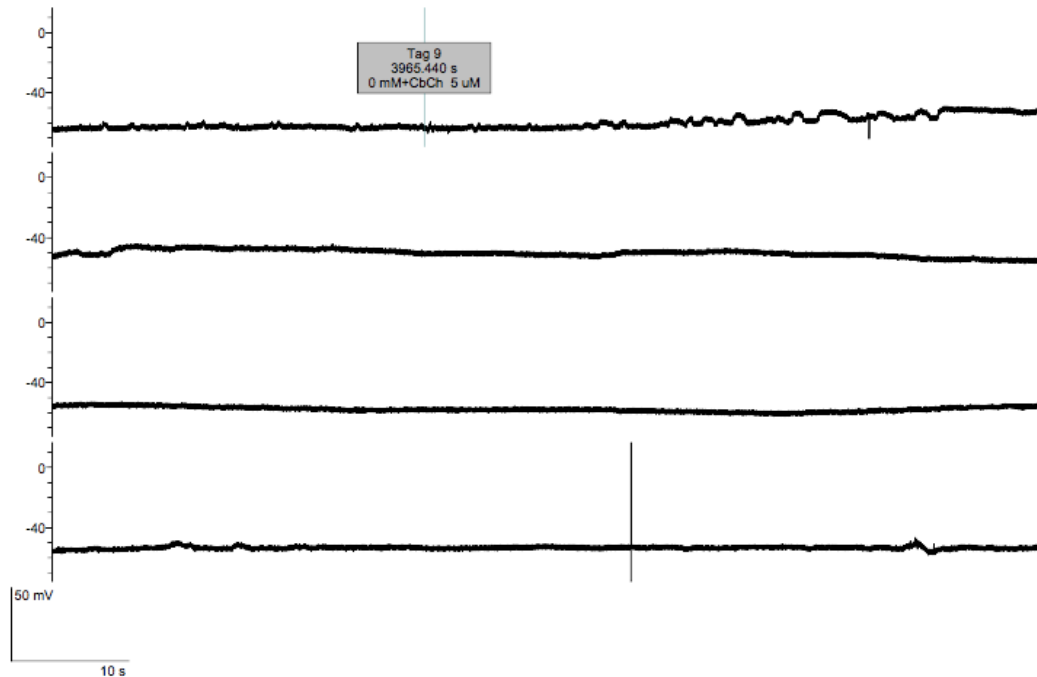


Figura 9: Efecto de carbacol en un medio sin glucosa.

En la figura número 9 se puede ver como, la célula β en un principio, al encontrarse bajo el efecto de 10 mM de glucosa, produce una serie de potenciales de acción que oscilan entre -60 a -20 mV, y con unos 4 bursts por minuto (dato no mostrado). Al quitarle el medio con glucosa, la célula deja de tener actividad eléctrica, y se queda en un estado basal de unos -60 mV. Para poder probar si el carbacol actúa como agente inductor o potenciador, tras unos minutos sin actividad, se le perfunde a la célula β , un medio con una concentración de 10 μ M de carbacol y sin glucosa. El efecto observado en este caso, es que la célula no sufre ningún cambio, es decir, sigue sin observarse actividad por parte de ésta.

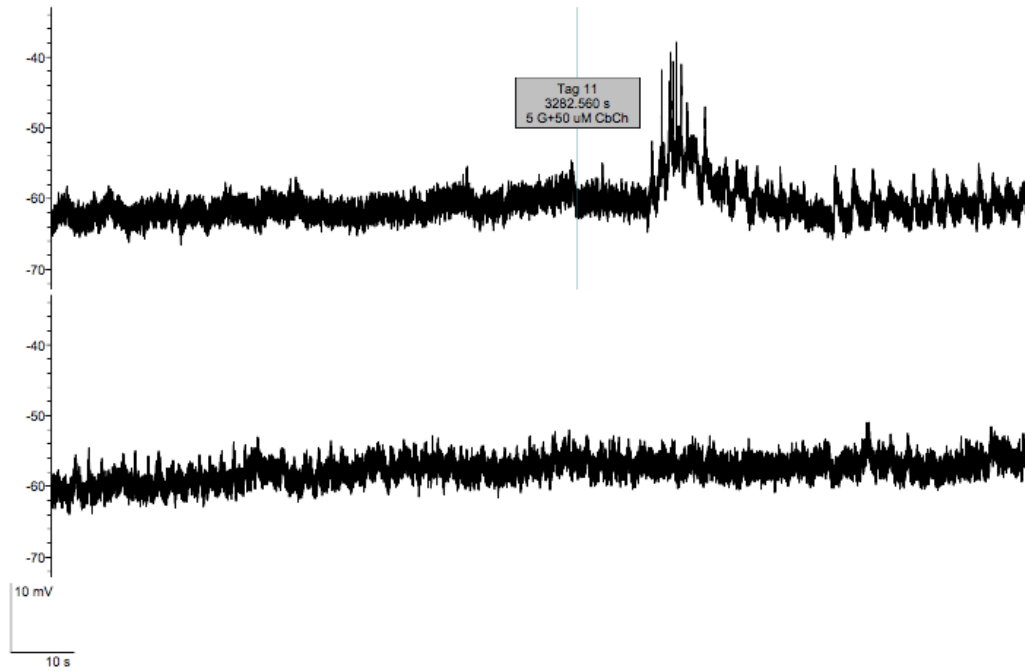


Figura 10: Efecto de carbacol sobre un medio 5 mM de glucosa.

En la figura 10, se puede observar como ante una concentración 5 mM de glucosa la célula β pancreática no tiene ningún tipo de actividad eléctrica. En el caso de que el carbacol fuese una sustancia inductora, tras sus administración se podría registrar algún tipo de actividad por parte de la célula β , sin embargo, se ve como la célula sigue silente tras la administración de una concentración de 50 μ M. Una vez retirado el carbacol, se inician una serie de espigas pero sin un patrón regular (dato no mostrado).

3.3 Efecto de carbacol sobre concentraciones supraestimuladoras de glucosa.

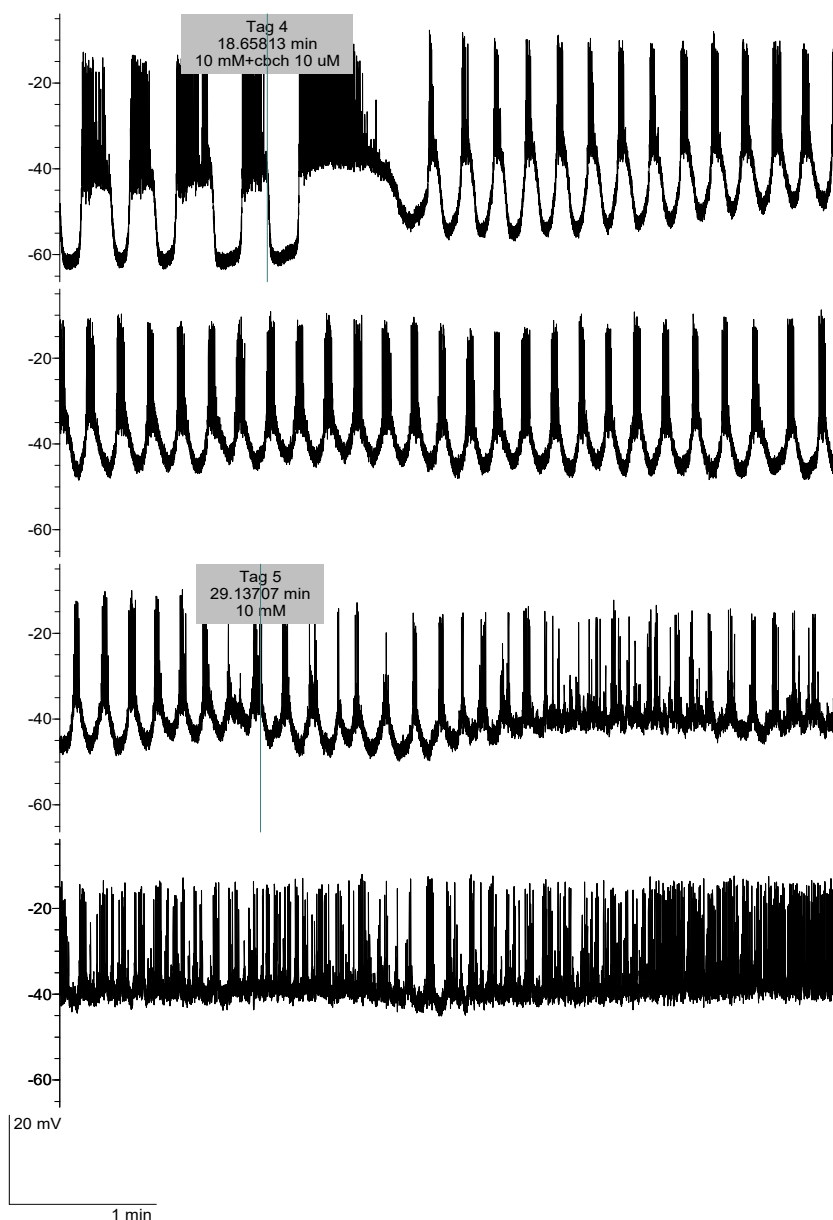


Figura 11: Efecto de carbacol 10 μ M sobre glucosa 10 mM.

En el presente caso (figura 11), se puede ver como se expone a la célula β a un medio con glucosa 10 mM pero con una concentración menor de carbacol (10 μ M). Se puede observar que, la célula β se encuentra a unos -60 mV en estado de reposo y que las espigas alcanzan unos -20 mV. La media de espigas precarbacol es de unas 83,34 por minuto y el porcentaje de tiempo en fase activa es de 53,53%. Tras la administración de carbacol, se consigue ver una hiperpolarización inicial de la célula β , que se continua

con un periodo de despolarizaciones frecuentes, pero de menor duración que en la ausencia de carbacol. También se logra observar como la línea base se encuentra en unos -45 mV. A los 11 minutos aproximadamente, se retiró el carbacol del medio, dejando solo la glucosa 10 mM, y se inició un proceso de despolarizaciones continuas, que no cesan e incluso la célula se queda sin periodo silente. Finalmente se introduce en un medio sin glucosa a la célula β para que, al no tener ningún estímulo excitador, pudiese volver a un estado de reposo (dato no mostrado).

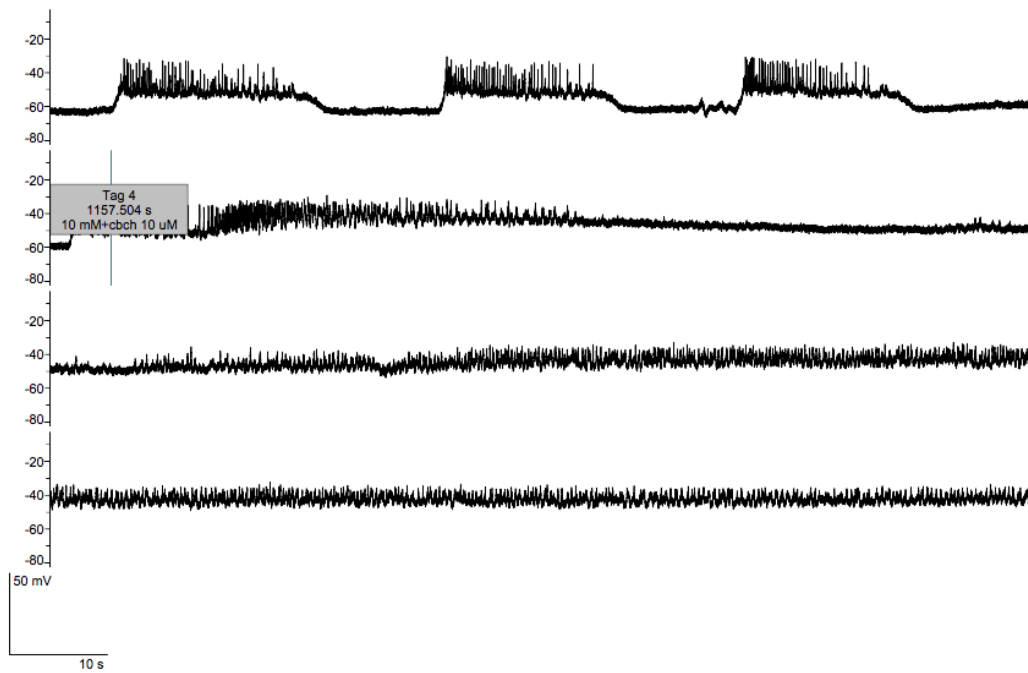


Figura 12: Efecto de carbacol 10 μ M sobre glucosa 10 mM.

En la figura 12, se observa como la célula β pancreática, al encontrarse en un medio con glucosa 10 mM, mantiene un ciclo de despolarizaciones de aproximadamente 2 bursts por minuto. A continuación se perfunde a la célula, en un medio con 10 μ M de carbacol. Tras esto, se inicia un periodo de hiperpolarización que dura aproximadamente 42 segundos, y que continua con un periodo continuo de oscilaciones sin fase silente, donde los potenciales varían desde -30 a -45 mV.

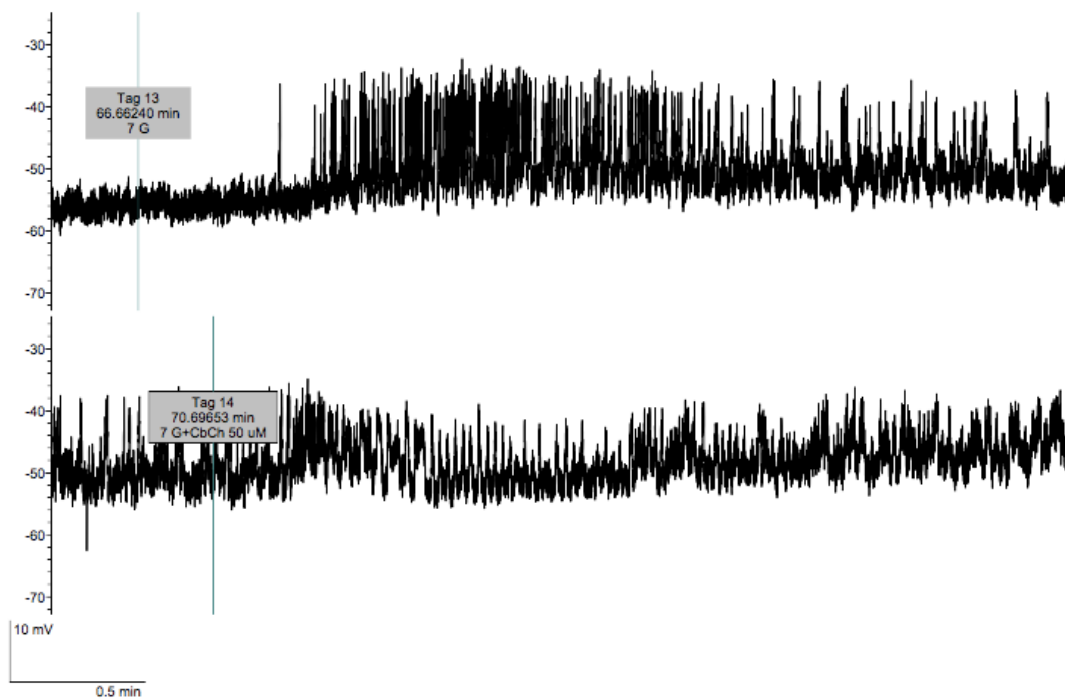


Figura 13: Efecto de carbacol 50 μ M sobre glucosa 7 mM.

En el registro que corresponde a la figura 13, se logra ver como la célula β ante una concentración 7 mM de glucosa inicia una serie de despolarizaciones continuas, que van disminuyendo en intensidad y frecuencia. Cuando se perfunde con 50 μ M de carbacol, el potencial de membrana asciende desde -60 mV a -50 mV, presentando un patrón de oscilaciones irregular.

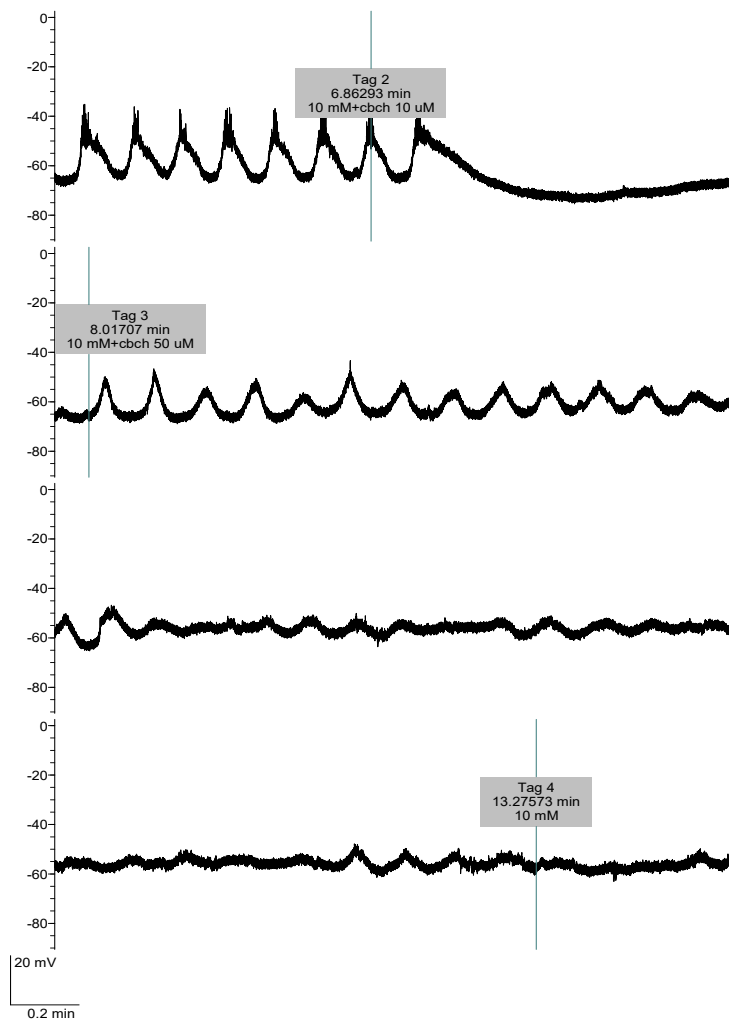


Figura 14: Efecto de carbacol 50 μ M sobre glucosa 10 mM.

En la figura 14 se puede ver un registro de la actividad eléctrica de la célula β en presencia de un medio con concentraciones estimuladoras, es éste caso glucosa 10 mM. Una vez estabilizada la células β pancreática, se perfunde en un medio de glucosa 10 Mm junto con carbacol 50 μ M, que produce una respuesta bifásica consistente en una primera descarga seguida de una hiperpolarización y a continuación un patrón oscilatorio de bursts diferentes de los obtenidos solo en presencia de glucosa. Si se mantiene el carbacol en el medio, la célula despolariza manteniéndose estable. Es remarcable en éste registro la ausencia de potenciales de acción en la cúpula de las descargas. Una vez retirado el carbacol tras unos siete minutos ,las despolarizaciones no cesan, y de nuevo se observan espigas que de media alcanzan una frecuencia de 19,51 espigas por minuto (datos no mostrados).

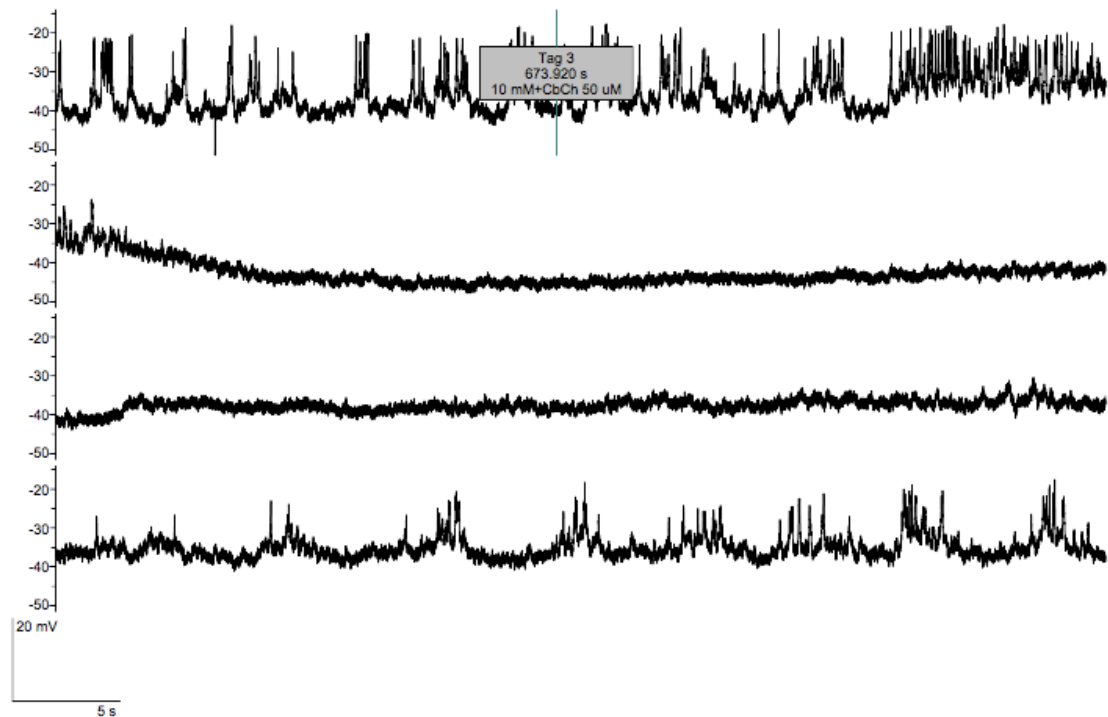


Figura 15: Efecto de carbacol 50 μ M sobre glucosa 10 mM.

En el registro mostrado en la figura 15 se observa una célula β pancreática perfundida con una concentración 10 Mm de glucosa, pero sin un patrón oscilatorio regular, que oscila entre -20 y -40 mV. A esta célula β se le añade una concentración de carbacol de 50 micromolar, que produce una hiperpolarización que dura unos 47 segundos. A continuación, se empieza a ver, un ascenso de la línea de base a unos -40 mV. Pasados unos segundos, se aprecia una frecuencia de despolarizaciones, que va aumentando con el tiempo hasta alcanzar una fase de despolarización continua sin fase silente en el minuto 3 del experimento. Es importante mencionar que esta fase se alcanza una vez se ha retirado el carbacol.

3.4 Resultados estadísticos.

En los experimentos realizados, se obtienen diferentes resultados, según el tipo de célula y la concentración de carbacol empleada, de tal forma, que se han analizado los registros más representativos.

En el experimento correspondiente a la imagen 11, se observa como al inicio de éste, la célula β pancreática en un medio con tan solo 10 mM de glucosa, tiene un tiempo en fase activa de 53,53 % y un número de espigas por minuto que se aproxima a 86,34 de media. Tras la aplicación de 10 μ M de carbacol y esperar unos minutos, estos valores cambian y se observa un porcentaje de tiempo en fase activa menor, de 28,94% de media, mientras que el número de espigas por minuto es de 56,51. Es decir, en este experimento, se observa como tanto el porcentaje de tiempo en fase activa como el número de espigas por unidad de tiempo disminuyen tras la aplicación de la sustancia colinérgica. Estos valores resultan significativos para ambos parámetros. El número de bursts previo al carbacol es de aproximadamente 4 por minuto, mientras, que en el registro posterior se puede observar como al inicio es de 5 y a medida que pasa el tiempo sobre el minuto 14, está cerca de 9 por minuto.

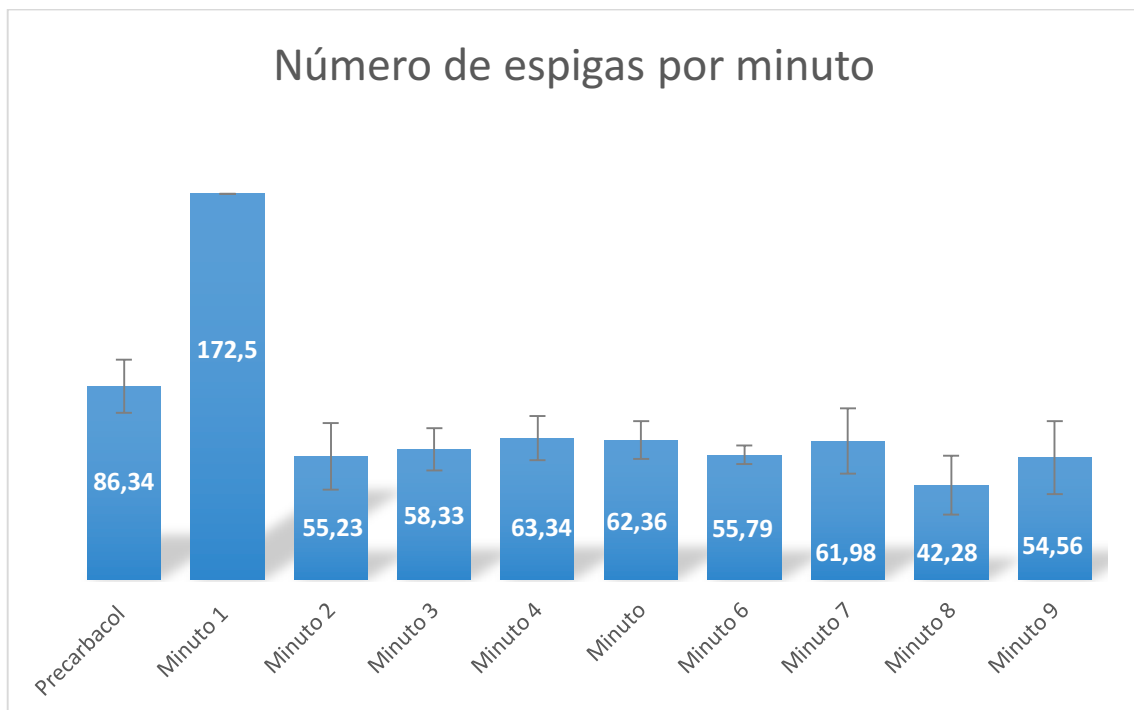


Figura 16. Diferencias en el número de espigas por minuto de la figura 11.

En el gráfico correspondiente a la figura 16 se puede observar la variación del número de espigas por minuto correspondiente a la figura número 11. Como se puede ver, tan solo en el primer minuto, el número de espigas aumenta significativamente por encima del estado previo con tan solo glucosa. A medida que van pasando los minutos, las espigas pasan a un número inferior si se compara con el que tenían al inicio.

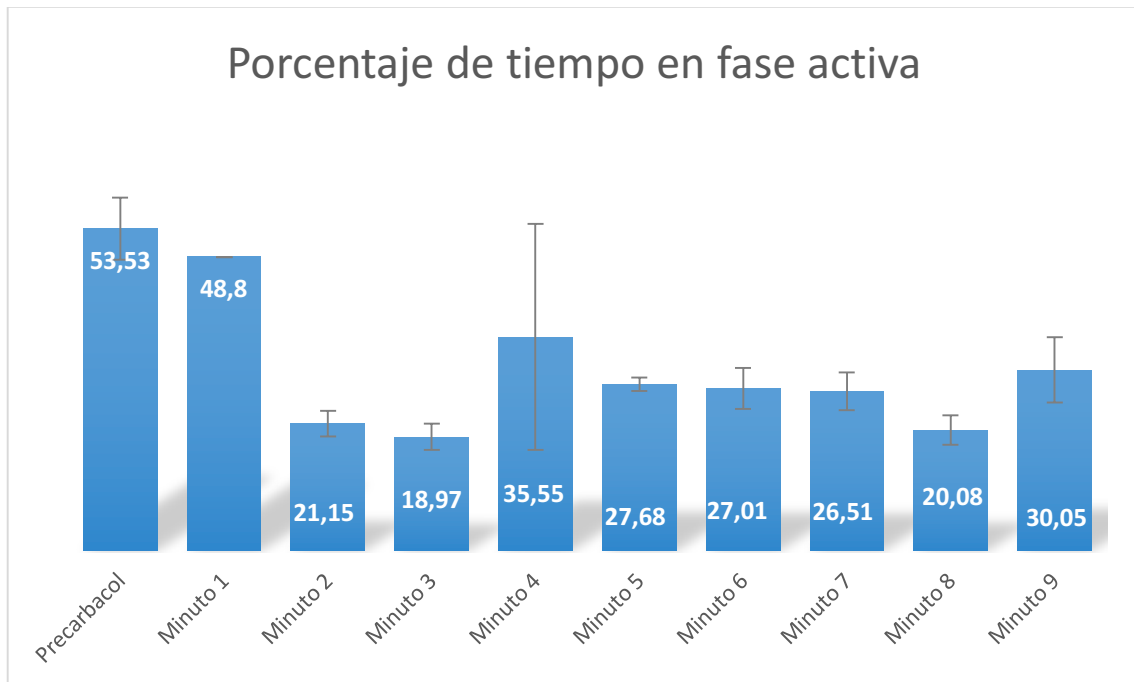


Figura 17. Porcentaje de tiempo en fase activa minuto a minuto de la figura 11.

En la figura 17 se puede observar el porcentaje de tiempo en fase activa del registro que corresponde a la figura 11. Al igual que pasa con el número de espigas, el porcentaje de tiempo en fase activa no aumenta a pesar de la introducción del carbacol.

Para contrastar la información anterior, se ha analizado el registro que corresponde a la figura 12, correspondiente al efecto de carbacol 10 μ M sobre 10 mM de glucosa. Al analizar el número de espigas por unidad de tiempo, se podría observar como tras la aplicación del agente muscarínico a una concentración de 10 μ M la media alcanza un valor de aproximadamente 200 espigas por minuto, en relación con la media en estado basal de la célula β que es de aproximadamente 16,048 por minuto. Consideramos este valor significativo. Por otro lado, al analizar el tiempo en fase activa vemos como el cambio resulta bastante significativo, pues pasa de una media de 97,56% a una activación continua en la que la célula está el 100% de tiempo activada y sin fase silente.

Sin embargo al hablar del número de bursts, no se podría hacer una comparativa, puesto que en la primera parte del experimento se obtienen aproximadamente 3 bursts por minuto, pero no hay bursts diferenciados tras la administración del carbacol.

En el experimento que corresponde a la imagen 14, y dónde se empleó una concentración de 50 μ M de carbacol en un medio con 10 mM de glucosa, se observa como el porcentaje de tiempo en fase activa antes de introducir la concentración de la sustancia colinérgica es de un 20,48%, con unas 21,86 espigas por minuto. No se podrían comprar estos parámetros con su valor postcarbacol puesto que no existen valores que se puedan analizar. El número de bursts si que se puede estudiar, y en este caso, tanto previo a la exposición muscarínica como post, el valor medio es de aproximadamente 7 bursts por minuto.

IV. DISCUSIÓN.

4.1 Discusión del método

4.1.1 Heterogeneidad de las células β .

La heterogeneidad de las células β ha recibido recientemente una atención creciente, y están surgiendo estudios que desafían nuestra comprensión de la identidad de las células β .

La existencia de variaciones funcionales dentro de la población de células β ofrecería ventajas por su capacidad para responder sólidamente a diferentes condiciones fisiológicas, especialmente teniendo en cuenta las consecuencias de tener una cantidad insuficiente o excesiva de insulina en el cuerpo. Es probable que la regulación precisa de la secreción de insulina sea difícil de lograr si todas las células β fueran homogéneas en sus capacidades de detección y secreción de glucosa ya que todas responderían simultáneamente con una fuerza similar a un estímulo dado, sin una capacidad inherente para adaptarse rápidamente a cambios. La existencia de subpoblaciones de células β con diferentes umbrales para la glucosa modularía la respuesta, y la secreción de insulina estaría más estrictamente regulada.²⁶

La heterogeneidad biológica de las células β a menudo se atribuye a la edad de éstas. Se cree que las células β secretoras de insulina del páncreas se renuevan lentamente, por lo que, se podría encontrar, las tres formas madurativas, es decir, estado maduro, inmaduros y senescente. Las células inmaduras son altamente proliferativas y no responden fuertemente a la estimulación con glucosa, pero secretan algo de insulina incluso a niveles basales de glucosa en sangre. Las células maduras proliferan en respuesta a estímulos externos y liberan insulina de forma robusta, secretando poca o ninguna insulina en condiciones basales. Las células viejas dejan de proliferar (se vuelven sinescentes) y pueden ser disfuncionales.²⁷

Por tanto se puede concluir que la respuesta diferente de las células β pueden ser atribuible al periodo del desarrollo en la que han sido estudiadas.

Esta supuesta heterogeneidad en la célula β nos ayuda a interpretar los resultados de nuestro experimento de tal forma que se ha expuesto a células β a diferentes concentraciones de carbacol, viendo diferentes respuestas con concentraciones similares. Es el caso de la figura 11 y la imagen 12. En ambos registros se expone a la célula β a una concentración de carbacol de 10 μ M. Mientras que en la

imagen 11 se ve como se producen las cinco fases típicas de respuesta a un agente muscarínico. En la imagen 12 se puede ver como otra célula β pancreática ante la misma concentración de carbacol, pasa directamente a una fase de activación continua sin periodo silente.

4.1.2 Diferencias entre islote humano y de roedor.

Conforme ha aumentado la incidencia de enfermedades relacionadas con el páncreas, principalmente la DM tipo 2, ha aumentado el interés por conocer los islotes pancreáticos y su funcionamiento. La diabetes es una enfermedad humana y podría plantearse la duda, a medida que se elabora éste trabajo, que las características del ratón, al ser un roedor y no un ser humano, hagan que los resultados expuesto dejen de tener validez. Existen algunos estudios que consideran la imposibilidad de extrapolar la información estructural o funcional de los roedores a la situación humana.²⁸ Otros estudios afirman que, aunque se ha demostrado que la inervación parasimpática del páncreas endocrino, los islotes de Langerhans, proporciona una entrada colinérgica a la célula en varias especies, el papel de la inervación colinérgica en la función de las células β humanas puede ser escasa. Estos estudios se basan en que por ejemplo, los pacientes vagotomizados tienen niveles séricos de insulina postprandial normales o los pacientes con diabetes tipo 1 que se han sometido a un trasplante de páncreas (y por lo tanto tienen islotes denervados) permanecen euglicémicos sin tratamiento.²⁹

Susan-Boner en el 2015 se planteó que el islote humano adulto es mucho más variable que el de los roedores, sin embargo en sus estudios más recientes, después de un reexamen de la arquitectura del islote humano, concluyó que el islote humano es similar al islote de roedor con respecto a la organización, composición y relación con los vasos sanguíneos intra-islotes y sus implicaciones. Y concluyó que hay mucha más variabilidad en la composición dentro de cada páncreas humano y entre diferentes páncreas humanos que con el páncreas de roedor.³⁰

En conclusión, el método seleccionado tiene limitaciones pero es un método aceptable.

4.2 Discusión de los resultados

4.2.1 Patrón de respuesta de célula β a glucosa.

Para poder valorar los resultados obtenidos en estos experimentos, primero se debe entender la secuencia en la que las permeabilidades iónicas, participan en la generación de la actividad eléctrica producida por la concentración de glucosa.

En un primer momento, la entrada de glucosa en la célula β , produce un aumento de ATP. Al aumentar la concentración intracelular de éste, se genera el cierre de los canales de potasio dependientes de ATP (K_{ATP}). La causa de la despolarización inicial no es más que la disminución de la permeabilidad de K^+ .

A continuación existen dos procesos consecutivos:

Un primer proceso de oscilación lenta, en el que al bloquear los canales de K^+ y llegar a un cierto grado de despolarización, se activan los canales de calcio de bajo umbral, lo que se puede resumir como la entrada de calcio dentro de la célula. Un segundo proceso, consecuencia de la despolarización anterior, consiste en la activación de los canales de calcio de alto umbral, y canales de K^+ dependientes de calcio. Ésta activación de canales, es la responsable de los potenciales de acción.

En resumen, se podría decir que la entrada de calcio produce dos efectos en la célula. Por un lado se inactivan los propios canales de Ca^{2+} , lo cual se puede evidenciar al ver que las espigas son cada vez más lentas, y por otro se activan los canales de K^+ dependientes de calcio que son los responsables de las repolarizaciones y de las despolarizaciones. Los canales de K^+ dependientes de calcio son sensibles a la concentración de calcio intracelular, de tal forma que cuando la concentración de calcio es alta, se activa, y producen una repolarización. A medida que la concentración de calcio intracelular disminuye, los canales de K^+ dependientes de calcio se cierra iniciando una nueva repolarización.

Como se puede observar en las imágenes 6 y 7, a partir de una concentración por encima de 15-20 mM de glucosa, se produce un bloqueo de los canales de K^+ dependientes de calcio, por lo que desaparece la actividad eléctrica oscilatoria y la célula descarga de forma ininterrumpida.

Efecto de glucosa subestimuladora: A concentraciones de 0 y 5 mM de glucosa, los canales K_{ATP} se mantienen abiertos de tal forma que no se pueden producir oscilaciones puesto que la membrana no puede despolarizarse.

Efecto de glucosa sobreestimuladora: Se producen todos los pasos mencionados en el apartado anterior.

Por tanto, la glucosa tiene dos tipologías de acción, subestimuladora y supraestimuladora, con respecto a la generación de actividad oscilatoria y entrada de calcio extracelular. No es descartable que se produzca secreción de insulina en concentraciones subestimuladoras de glucosa por cuanto se ha descrito secreción continua, pero a estas concentraciones deberá producirse a través de la vía amplificadora (figura 1). Solo a concentraciones sobreestimuladora se podrá contar con la participación del calcio entrando desde el medio extracelular.

De forma ocasional, se registran respuestas atípicas de la célula β del páncreas ante la estimulación por glucosa. Con respuesta atípica, se entiende aquella que no presenta ninguno de los componentes de oscilación periódica propios del comportamiento típico de la célula β en presencia de glucosa a concentraciones supraestimuladoras. En los registros obtenidos, se tiene el ejemplo de la figura 15, donde se puede ver como una concentración 10 mM de glucosa, la célula β no responde de manera regular, presentando al inicio del experimento un patrón irregular y caótico.

4.2.2 Efecto de carbacol sobre glucosa subestimuladora.

En los registros que corresponden a la figuras 9 y 10, se observa como el carbacol sin glucosa, no tiene efecto sobre la célula β . Por tanto, puede concluirse que el carbacol no tiene efecto inductor. No obstante este tipo de efectos es poco probable que se de a condiciones normales en cuanto la glucemia en el organismo del ratón está muy regulada, concretamente sobre concentraciones de 7 mM. Pero estos datos apuntan en la dirección de que la acción vagal sería ineficiente en condiciones de hipoglucemia, condición frecuente en la DM tipo 2, como consecuencia de algunas terapéuticas. Alternativamente, cabría la posibilidad de que la acción vagal sobre concentraciones subestimuladoras de glucosa se produjera a través de la vía amplificadora. No obstante, parece poco probable por cuanto se ha reportado que en éstas condiciones no se incrementa la secreción de insulina.

4.2.3 Efecto de carbacol sobre glucosa supraestimuladora.

Para ilustrar el efecto de los agentes muscarínicos sobre la actividad eléctrica inducida por la glucosa, se ha seleccionado un ejemplo que se puede observar en la siguiente figura.

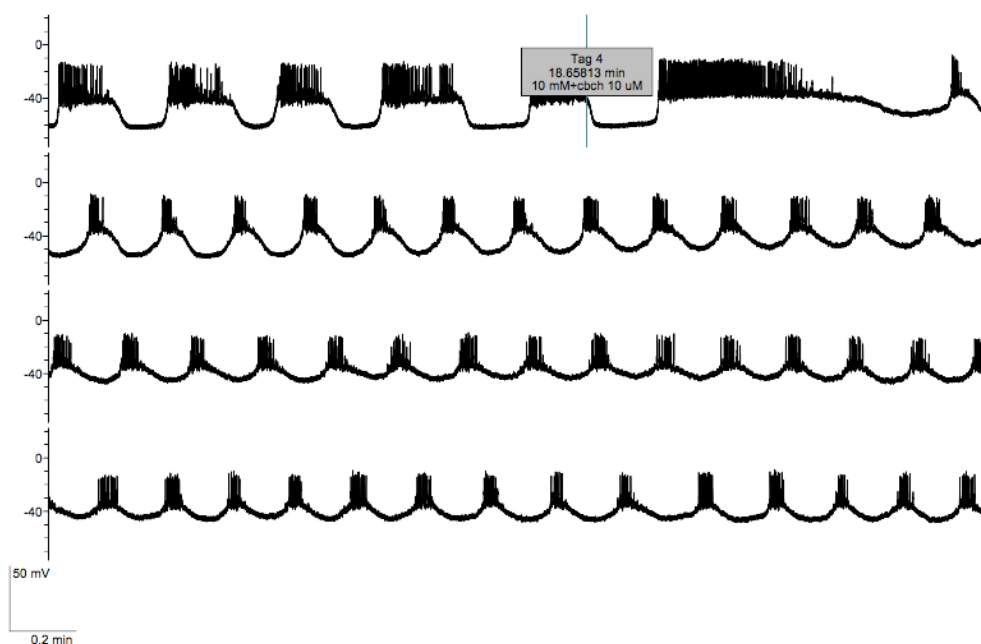


Figura 18. Efecto de los agentes muscarínicos sobre la actividad eléctrica inducida por glucosa en la célula β .

En esta figura se advierte el patrón típico de respuesta de la célula β pancreática a los agentes muscarínicos. La aplicación de carbacol en la célula β en presencia de glucosa, da lugar a un patrón de respuesta, que puede describirse como una serie de fases.

Es importante mencionar que la duración y la intensidad de las mismas depende de la concentración del agente.

1ª fase: Despolarización relativamente duradera.

2ª fase: Hiperpolarización.

3ª fase: Descargas en alguna medida similares a las de glucosa pero que no necesariamente tienen potenciales de acción en su cúpula.

4ª fase: Fase continua.

5ª fase: Efecto remanente.

En la primera fase de despolarización relativamente duradera, se puede advertir, que se caracteriza un aumento de la entrada de calcio como se indica en el estudio cuantitativo, en el que se observa un aumento del número de espigas en comparación con el periodo control donde la célula β está solo expuesta a glucosa.

La segunda fase consiste en una hiperpolarización que parece ser directamente proporcional a la concentración de agonista que se ponga en la solución, es decir, a mayor cantidad de colinérgico, mayor intensidad tendrá la hiperpolarización y viceversa. Esta hiperpolarización puede ser debida a una activación de los canales de K^+ dependiente de calcio secundaria a la entrada masiva de calcio producida en la fase anterior. En todo caso, se trata de una fase que se observa preferentemente con el uso de concentraciones altas de carbacol, probablemente en el rango farmacológico, por consiguiente, se le adjudica un papel menor en condiciones fisiológicas.

Durante la tercera fase, las descargas observadas tienen similitudes con las desencadenadas por la glucosa. Se ha procedido a analizar sus características cuantificando el porcentaje de tiempo, en fase activa, encontrando que existe una disminución con respecto al patrón de glucosa. Por otro lado se ha analizado el número de potenciales de acción por unidad de tiempo que es menor y significativamente diferente del observado tanto en la primera fase como en presencia de glucosa. Por éste motivo difícilmente puede esperarse que la acción sostenida del carbacol derive de la activación de la vía iniciadora, más bien, se podría esperar que entrara en juego la vía potenciadora (vía de la incretinas).

En la fase continua, se puede observar como desaparecen las hiperpolarizaciones apareciendo un patrón de actividad continuo. Si se analiza este patrón, y es comparado con el previo en el que solo había glucosa, se podría cuantificar que el porcentaje de tiempo en fase activa se acerca al 100%, incrementándose también el número de espigas por minuto. Cabe mencionar, que el registro que se ha seleccionado, ésta fase continua se produce una vez se ha retirado el carbacol. Esto hace pensar que existe una quinta fase, que es la que se describe a continuación.

La quinta fase, se ha denominado, efecto remanente, y es que, se observa que tras la retirada del carbacol, existe un efecto duradero, es decir, que la acción que produce el carbacol se prolonga hasta 20-30m con apenas unos minutos de exposición a la célula β . Esto sugiere que la acción muscarínica produce efectos duraderos solo reversibles con el paso del tiempo.

4.2.4 Entrada de calcio y liberación de insulina.

La señalización intracelular de calcio en la célula β desempeña una función esencial en el acoplamiento entre el metabolismo de la glucosa y la secreción de insulina. Está claro que la despolarización inicial depende de la apertura de los canales de calcio de bajo umbral, mientras que los potenciales de acción nos indican la entrada por los canales de calcio de alto umbral.

Se puede observar como al inicio de la perfusión con carbacol, se produce un aumento del número de espigas, que hacen referencia a la entrada de calcio a la célula por los canales de calcio extracelular. Esto, parece que apunta a la hipótesis de que el carbacol tiene un efecto potenciador sobre la célula β . Sin embargo al contar el número de espigas unos minutos después, no se ve un aumento de éstas, si no que parece que se reduce el número de espigas con respecto al estado basal, y por tanto, se podría concluir que no existe una entrada de calcio por los canales de calcio extracelular. Sin embargo se podría plantear que la liberación de calcio se produce por otra vía, como podría ser la vía de las incretinas, donde se produce una liberación de calcio por los depósitos intracelulares. Dicho proceso no puede ser objetivado en los registros.

Por tanto, en conjunto con los datos obtenidos se podría interpretar que como el carbacol es potenciador, pero no se observan cambios eléctrico en la célula β , el aumento intracelular de calcio, puede tener su origen en una vía distinta a la de iniciación. De tal forma, que deberíamos estudiar otro parámetro de medida que no fuese el número de espigas.

4.2.5 Sistema parasimpático y obesidad.

La obesidad es cada vez un problema más prevalente en nuestro medio, según la OMS en el 2016, el 39% de las personas adultas de 18 años o más, tenían sobrepeso, y el 13% eran obesas.³¹ El sobrepeso y la obesidad se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. Para determinar si existen alteraciones en el peso corporal, se utiliza el índice de masa corporal (IMC). El IMC se calcula dividiendo el peso corporal, en kg, por el cuadrado de la altura, en metros. Valores de $IMC \geq 25$ indican sobrepeso y valores de $IMC \geq 30$ indican obesidad. Un IMC elevado se ha relacionado con un mayor riesgo de padecer diversas patologías crónicas como enfermedades cardiovasculares, cáncer y diabetes mellitus tipo 2.⁹

La actividad parasimpática está mediada en gran parte por el nervio vago que constituye una vía importante para la transmisión de señales a muchos órganos y es responsable entre otros de regular el movimiento gastrointestinal y la digestión de alimentos, además de mejorar la secreción de insulina.³² Los estudios emergentes muestran que la disfunción de las vías vagales probablemente estén involucradas en el desarrollo y mantenimiento de la obesidad.¹¹

Por un lado, el nervio vago por medio de la acetilcolina, produce un efecto potenciador sobre los receptores M3 del páncreas. Al potenciar la secreción de insulina, ésta por su naturaleza anabólica, mejora la síntesis de lípidos celulares y la absorción de glucosa, lo que provoca el almacenamiento de calorías y la ganancia de grasa.³² Por tanto se podría concluir que un exceso de estimulación vagal sobre el páncreas (producido por ejemplo, por un aumento constante de la cantidad de glucosa en sangre), podría producir un aumento de la secreción de insulina, generando el almacenamiento de calorías y finalmente problemas de exceso de peso.

El nervio vago, inerva entre otros al estómago y al intestino, y por medio de mecanorreceptores o receptores hormonales, es capaz de enviar información saciante al cerebro cuando se produce dilatación del estómago, o bien enviar información que aumente o estimule la ingesta de alimentos según se liberen hormonas anoréxicas (que inhiben la ingesta de alimentos) u hormonas orexígenas (que estimulan la ingesta de alimentos). De ésta forma, si el nervio vago sufriese una disminución de su actividad, se podría concluir que la expresión de saciedad quedaría atenuada mientras que los receptores orexígenos permanecerían continuamente expresados. Ésta disminución de actividad, está definida por algunos estudios, que afirman que las dietas ricas en grasas son las responsables de dicha desregulación. Se postularía por tanto que las dietas ricas en grasas, pueden producir la reducción de la señalización de saciedad al cerebro y el aumento de la sensibilidad a señales orexígenas periféricas, promoviendo el consumo excesivo de alimentos y posteriormente, conduciría a la obesidad.³¹

4.2.6 Posible uso clínico de agonistas muscarínicos en el tratamiento de la DM.

La administración de un agonista muscarínico representa una posible vía para el tratamiento de la DM tipo 2, debido a su efecto potenciador sobre la liberación de insulina. Sin embargo, cabe señalar que los receptores muscarínicos M3 no sólo están en el páncreas, y desempeñan un papel clave en la mediación de la contracción del músculo liso y en la acción de activación de la mayoría de las glándulas endocrinas y

exocrinas. Por lo tanto, el uso clínico potencial de agentes que promueven selectivamente la señalización a través del M3R puede estar limitado por los efectos secundarios periféricos.

Lo más reciente con respecto a tratamientos de la DM tipo 2 y su relación con el sistema colinérgico, es un estudio publicado en el 2017 titulado “Glibenclamide treatment blocks metabolic dysfunctions and improves vagal activity in monosodium glutamate-obese male rats”. En él se estudia el comportamiento de la glibenclamida, un fármaco utilizado para la DM tipo 2, y que pertenece al grupo de las sulfonilureas, es decir, su mecanismo de acción es aumentar la secreción de insulina por parte de las células β pancreáticas. Este estudio concluye que el tratamiento con glibenclamida mejora los signos de disfunción prediabéticos, en las que se incluye la desregulación del sistema nervioso parasimpático.

VI. Conclusiones.

1. La glucosa tiene dos tipos de acción, subestimulante y supraestimulante, con respecto a la generación de actividad oscilatoria y la entrada de calcio extracelular.
2. La acción del carbacol sobre glucosa subestimulante no tiene ningún efecto sobre la célula β . Por lo tanto, se puede concluir que el carbacol no tiene efecto inductor.
3. La aplicación de carbacol en la célula β en presencia de glucosa supraestimuladora, da lugar a un patrón de respuesta, que puede describirse como una serie de fases: 1ª fase: despolarización relativamente duradera, 2ª fase: hiperpolarización, 3ª fase: descargas en cierta medida similares a la glucosa pero que no necesariamente tienen potenciales de acción en su meseta, 4ª fase: fase continua, 5ª fase: efecto remanente.
4. La administración de un agonista muscarínico podría representar una ruta posible para el tratamiento de la DM tipo 2, debido a su efecto potenciador sobre la liberación de insulina. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que los receptores muscarínicos M3 no solo se encuentran en el páncreas, y juegan un papel clave en la mediación de la contracción del músculo liso y en la acción de activación de la mayoría de las glándulas endocrinas y exocrinas. Por lo tanto, el posible uso clínico de agentes que promuevan selectivamente la señalización a través de M3R puede verse limitado por los efectos secundarios periféricos.

VII. Agradecimientos.

De todas las personas que han hecho posible este trabajo de fin de carrera, me gustaría agradecer en primer lugar a mi tutor, el Dr. Juan Vicente Sánchez Andrés, por brindarme la oportunidad de llevar a cabo esta experiencia en su laboratorio.

Quiero expresar mi agradecimiento a todos los profesores de la Universidad Jaume I que han participado y se han interesado en éste trabajo.

A mis grandes amigas, Coral y Ana, por aguantar día a día mis “idas y venidas” con la falta de resultados y mi preocupación constante por la longitud del proyecto. A Alberto, por saberse la exposición mejor que yo misma.

Por ultimo, gracias a mi familia. Por estar siempre ahí. A mis padres, Carmen y Jose, por ayudarme a lograr la mayor ilusión de mi vida y por apoyarme en todo momento. A mi hermana, Nani, por aguantarme todo este tiempo. A mi abuela y mi abuelo, por su constante interés en saber qué tal me iba con “mis ratas”. A mis tíos y primos por apoyarme y animarme a lograr este sueño que se está haciendo realidad.

Gracias a todos, porque sin vosotros no habría sido posible terminar este trabajo.

VIII. Bibliografía.

1 Jouvett, N. & Estall, J. L. **The pancreas: bandmaster of glucose homeostasis.** *Exp. Cell Res.* 2017;36: 19–23.

2 Sanchez-Andres JV, Takeda Y and Holz, G. **Pancreas and Insulin.** *Cell Physiology Source (5ª edición)*2018

3 Suzan A. ElSayed; Steve S. Bhimji. **Physiology, Endocrine, Pancreas.** *StatPearls.*

4 Budipitojo T, Fibrianto YH, Mulyani GT. **The types of endocrine cells in the pancreas of Sunda porcupine (*Hystrix javanica*).** *Veterinary World.* 2016; 9 :563-567.

5 Netter. **Atlas de anatomía humana.** (6ª edición) 2015.

6 Mergenthaler P, Lindauer U, Dienel GA, Meisel A. **Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function.** *Trends in neurosciences.* 2013;36 :587-597.

7 Yagihashi S, Inaba W, Mizukami H. **Dynamic pathology of islet endocrine cells in type 2 diabetes: β -Cell growth, death, regeneration and their clinical implications.** *Journal of Diabetes Investigation.* 2016;7: 155-165.

8 OMS **Informe mundial sobre la diabetes.** Ginebra 2016.

9 Esperanza Irlles Vidal **Adaptaciones funcionales de la célula beta pancreática en un modelo de obesidad genética en ratón** 2015.

10 Trajkovski M, Wollheim CB. **Physiology: microbial signals to the brain control weight.** *Nature.* 2016; 534:185.

11 Guillaume de Lartigue **Role of the vagus nerve in the development and treatment of diet-induced obesity** *The Journal of Physiology.* 2016;594: 5791–5815 .

12 Sanchez Andres J.V. **Modulación muscarínica de la actividad eléctrica y secretora de la célula beta pancreática.** 1987.

13 Kemp C. B., Knight M. J., Scharp D. W., Ballinger W. F., Lacy P. E., **Effect of transplantation site on the results of pancreatic islet isografts in diabetic rats.** *Diabetologia* 1973;9 :486–491.

14 Doliba NM, Liu Q, Li C, Chen P, et al. **Inhibition of cholinergic potentiation of insulin secretion from pancreatic islets by chronic elevation of glucose and fatty acids: Protection by casein kinase 2 inhibitor** Matschinsky FM. *Molecular Metabolism*. 2017;6: 1240-1253.

15 Velasco M, Diaz-Garcia CM, Larque C, Hiriart M. **Modulation of Ionic Channels and Insulin Secretion by Drugs and Hormones in Pancreatic Beta Cells.** *Molecular pharmacology*. 2016;90 :341–357.

16 McKenna JP, Ha J, Merrins MJ, et al . **Ca²⁺ effects on ATP production and consumption have regulatory roles on oscillatory islet activity.** *Biophysical Journal* 2016; 110: 733-742.

17 Merrins MJ, Poudel C, McKenna JP, et al. **Phase Analysis of Metabolic Oscillations and Membrane Potential in Pancreatic Islet β -Cells.** *Biophysical Journal*. 2016; 110 :691-699.

18 Croizier S, Prevot V, Bouret SG. **Leptin Controls Parasympathetic Wiring of the Pancreas During Embryonic Life.** *Cell reports*. 2016;15: 36-44.

19 Thorens B. **Brain glucose sensing and neural regulation of insulin and glucagon secretion.** *Diabetes Obes. Metab.* 2014;1: 82–88.

20 Richard S. Snell. **Neuroanatomia clinica** (6^a edición) 2007.

21 Nakajima K, Jain S, Ruiz de Azua I, McMillin SM, Rossi M, Wess J. **Minireview: Novel Aspects of M₃ Muscarinic Receptor Signaling in Pancreatic β -Cells.** *Molecular Endocrinology*. 2013;27: 1208-1216.

22 Patrick Delmas and David A. Brown **Pathways modulating neural KCNQ/M (Kv7) potassium channels** *Nature Reviews Neuroscience* 2005;6: 850–862.

23 Herrington J, Sanchez M, Wunderler D, et al. **Biophysical and pharmacological properties of the voltage-gated potassium current of human pancreatic beta-cells.** *The Journal of Physiology* 2005;567: 159–175.

24 Cuiñas A, García- Morales V, Viña D et al. **Activation of PKA and Epac proteins by cyclic AMP depletes intracellular calcium stores and reduces calcium availability for vasoconstriction.** *Life Sci.* 2016;15:102-109.

25 Guyton,, John E. Hall, **Tratado de Fisiología médica.** (13ª edición) 2016.

26 Gutierrez GD, Gromada J, Sussel L. **Heterogeneity of the Pancreatic Beta Cell.** *Frontiers in Genetics.* 2017;8: 22.

27 Bonne-Weir, S. y Aguayo-Mazzucato, C. **Pancreatic β -cell heterogeneity revisited.** *Nature* 2016;6: 535.

28 Rodriguez-Diaz R, Dando R, Jacques-Silva MC, Fachado A et al. **Alpha cells secrete acetylcholine as a non-neuronal paracrine signal priming beta cell function in humans.** *Nat Med.* 2011;17: 888-892.

29 Molina J, Rodríguez-Díaz R, Fachado A, et al. **Control of Insulin Secretion by Cholinergic Signaling in the Human Pancreatic Islet** *Diabetes* . 2014;63: 2714-2726.

30 Bonner-Weir S, Sullivan BA, Weir GC. **Human Islet Morphology Revisited: Human and Rodent Islets Are Not So Different After All.** *Journal of Histochemistry and Cytochemistry.* 2015;63: 604-612.

31. **OMS Obesidad y sobrepeso** 2017.

32. De Lartigue G. **Role of the vagus nerve in the development and treatment of diet-induced obesity.** *The Journal of Physiology.* 2016;594: 5791-5815.

