

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

# MEDICINA

Universidad de La Laguna

Trabajo Final de Grado

CURSO ACADÉMICO 2017-2018

ESTUDIANTES

**Beatriz Sánchez Estévez**

y

**Claudia Cartié Iglesias**

Tutores:

Dr. José David Machado Ponce

Profesor Contratado Doctor

Ayoze González Santana

Investigador

Departamento de Medicina Física y Farmacología

Dr. José David Machado, coordinador e investigador principal del grupo de investigación *Biología del tráfico de vesículas secretoras* y profesor de la Unidad de Farmacología de la Facultad de Medicina:

NOTIFICO:

Que el trabajo de investigación titulado “*Vivir sin adrenalina: un reto en la homeostasis de la glucosa*” ha sido elaborado bajo mi supervisión, tutorizado por Ayoze González Santana y realizado por las alumnas, Claudia Cartié Iglesias y Beatriz Sánchez Estévez durante este curso académico 2017-2018.

Una vez revisada la memoria final, doy mi consentimiento para ser presentado y evaluado por el tribunal designado para tal fin.

Para que conste, firmo el presente certificado

en La Laguna a 2 de mayo de 2018

  
Dr. José David Machado Ponce

## Glosario

A	Adrenalina
ACh	Acetilcolina
ATP	Trifosfato de adenosina
CA	Catecolaminas
DA	Dopamina
D $\beta$ H	Dopamina $\beta$ -hidroxilasa
DHBA	Ácido dihidroxibenzóico
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
EDTA	Etilendiaminotetraacético
GIP	Polipéptido inhibidor gástrico
GLP-1	Péptido similar al glucagón tipo 1
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HTA	Hipertensión arterial
LAAD	L-aminoácido aromático descarboxilasa
L-DOPA	L-dihidroxifenilalanina
mRNA	ARN mensajero
NA	Noradrenalina
NaAc	Acetato de sodio
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PKU	Fenilalanina 4-hidroxilasa
Pnmt-KO	Ratón deficiente en la enzima feniletanolamina-n-metil-transferasa
SD	Desviación estándar
STD	Estándar
TH	Tirosina hidroxilasa
VMAT	Transportador vesicular de monoaminas
WT	Ratón control

## **Resumen**

Los Pnmt-KO son ratones modificados genéticamente que no expresan adrenalina (A). Estudios previos del laboratorio reflejan que presentan un peso menor pero una glucemia basal ligeramente mayor que los WT y que esta no se ve modificada por estados de ayuno o postprandiales. Se sabe que la A juega un papel importante en la regulación homeostática de la glucosa actuando a diferentes niveles. Por lo tanto, nos parece interesante estudiar cómo responden estos ratones ante una hipoglucemia secundaria a la administración de insulina.

Por otra parte, la exendina es un fármaco aprobado clínicamente para el tratamiento de la Diabetes Mellitus tipo 2. Se trata de un análogo incretínico que aumenta la secreción de insulina por parte de las células pancreáticas, ayudando a reducir la glucemia. Asimismo, se conoce que tiene varias ventajas con respecto a otros antidiabéticos, como la mejora del control glucémico resistente a metformina, la pérdida de peso y la disminución del riesgo de provocar hipoglucemias secundarias. Además, se ha visto implicada en la regulación de otros tipos celulares que intervienen a nivel cognitivo y en enfermedades degenerativas. Es por ello que nos preguntamos si también tendrá alguna acción sobre las células adrenales aumentando la síntesis de adrenalina.

Para comprobarlo, nos planteamos un estudio piloto donde someteremos a ratones WT y Pnmt-KO a un tratamiento con exendina y valoraremos mediante HPLC y PCR su efecto sobre la síntesis de catecolaminas (CA).

**Palabras Clave:** Incretinas, adrenalina, pnmt-ko

## **Abstract**

Pnmt-KO are genetically modified mice which do not express adrenaline (A). Previous laboratory research indicates that they present lower weight but a slightly higher basal glycaemia than WT and that this is not modified by fasting or postprandial states. It is known that A plays an important role in homeostatic glucose regulation acting at different levels. Therefore, we find it interesting to study how these mice respond to secondary hypoglycemia to insulin administration.

On the other hand, exendin is a clinical drug for type 2 Diabetes which works as an incretin analog. That's why it increases the insulin secretion by pancreatic cells helping to reduce glycemia. Moreover, it is known that it has several advantages comparing to other treatments used, such as the improvement in metformin resistant diabetes, weight loss and its low risk of induced secondary hypoglycemias. In addition, it has been implicated in other cell types regulation that plays an important role at the cognitive level and in degenerative diseases. That's why we wonder if it will also regulate the adrenaline (A) synthesis by the adrenal cells.

To prove this, we propose a pilot study where some WT and Pnmt-KO mice are going to be treated with exendin to evaluate its effect on the catecholamines (CA) synthesis by means of HPLC and PCR.

**Key Words:** Incretins, adrenaline, pnmt-ko

## 1. Introducción

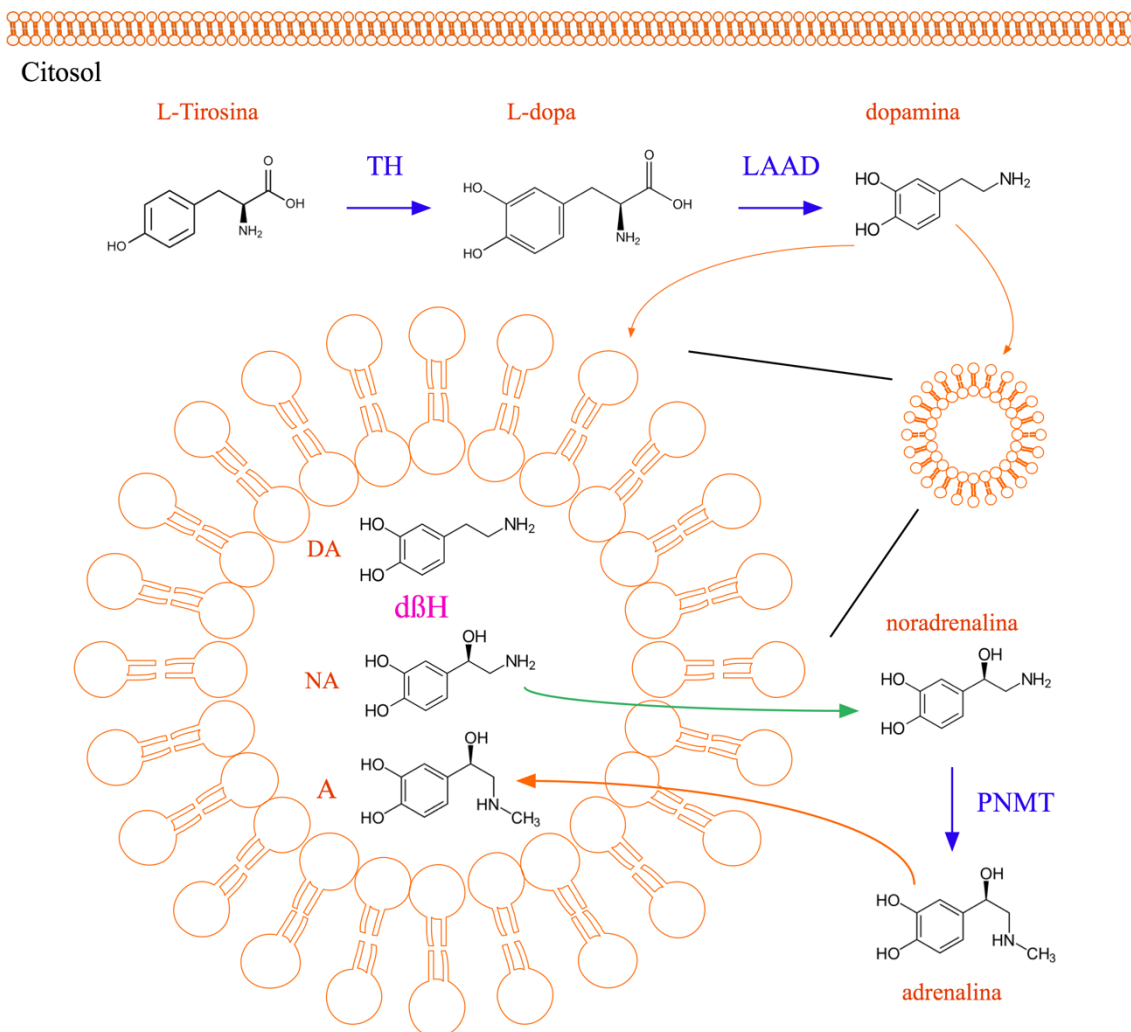
En el proceso de adaptación y supervivencia biológica es fundamental mantener la homeostasis interna. Para ello, las glándulas suprarrenales juegan un papel fundamental.

Las glándulas suprarrenales son dos estructuras retroperitoneales localizadas en el polo superior de los riñones y anatómicamente están divididas en corteza y médula. Es en la médula el lugar donde se sintetizan, almacenan y liberan las catecolaminas A y noradrenalina (NA). Además, encontramos cuatro fenotipos celulares distintos: las cromafines adrenérgicas, las cromafines noradrenérgicas, las pequeñas células intensamente fluorescentes que secretan NA, y las neuronas ganglionares que pueden ser noradrenérgicas o colinérgicas.

La anatomía macroscópica y la composición celular de las glándulas varía entre especies. En ratones y humanos predominan las células adrenérgicas con una proporción de 80-85% y 75% respectivamente (D. Aunis & K. Langley, 1999), y una relación A y NA de 60 a 40 en ratones y 70 a 30 en la especie humana.

Las CA derivan del aminoácido L-tirosina, que da lugar a L-DOPA y seguidamente a dopamina (DA). La primera reacción se lleva a cabo por la enzima tirosina 3-hidroxilasa (TH), seguidamente por la L-aminoácido aromático descarboxilasa (LAAD) junto con fosfato de piridoxal como cofactor. A continuación, la DA produce NA que genera A. En primer lugar, actúa la enzima dopamina  $\beta$ -hidroxilasa ( $D\beta H$ ) con los cofactores oxígeno y L-ascórbico, y después la feniletanolamina N-metiltransferasa (PNMT) con S-adenosil-L-metionina como cofactor.

Medio extracelular



**Figura 1. Esquema representativo de la síntesis de CA.** En azul se muestran las enzimas citosólicas mientras que en rosa se muestra la enzima intragranular  $D\beta H$ .

La A y NA pueden actuar localmente de manera paracrina o endocrina, pasando a la circulación sanguínea, para modular territorios periféricos ante situaciones de estrés. Ambas se fabrican principalmente en las células cromafines adrenales, que forman parte de un tejido de naturaleza endocrina procedente de la cresta neural. Estas células también liberan en menor medida DA, péptidos opioides, ATP y cromograninas. Se organizan en racimos pericapilares centrales (células noradrenérgicas) y periféricos (células adrenérgicas) (Livett et al., 1982). Mediante mecanismos de exocitosis dependiente de calcio ( $Ca^{2+}$ ) secretan estas sustancias a la circulación sanguínea. Al ser células excitables

son capaces de disparar potenciales de acción e inducir la apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje dependientes, y así entra el catión al interior celular y desencadenar la exocitosis.

La afinidad de la exocitosis por  $\text{Ca}^{2+}$  es diferente en células adrenérgicas y noradrenérgicas (Chasserot-Golaz et al., 1996). Fisiológicamente, ante una estimulación constante de la glándula suprarrenal, se produce un proceso de desensibilización de la célula cromafín que secreta gradualmente menos gránulos. Así se protege al organismo de la toxicidad del  $\text{Ca}^{2+}$  y de las CA impidiendo los efectos irreversibles de este último, como son la insuficiencia cardíaca, el edema pulmonar y el coma por HTA.

El  $\text{Ca}^{2+}$  puede ser regulado tanto intracelular como extracelularmente. Por un lado, depende de la actividad exocitótica de las células vecinas, como el ATP y los opiáceos secretados junto con las CA (Gandía et al., 1998). Por otro lado, los patrones excitatorios de la médula suprarrenal influyen en la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  y en el tipo de CA secretada. Se sabe que el  $\text{Ca}^{2+}$  provoca la secreción de NA más eficazmente que la de A (Teraoka H et al., 1993) y que las células cromafines adrenérgicas requieren 10 veces menos concentración de este catión (Aunis et al., 1999). Asimismo, los terminales en las células de NA difieren morfológicamente con los de las células de A, debido a que cada fenotipo está innervado por diferentes fibras. (Aunis et al., 1999).

No obstante, la vía principal encargada de la liberación de CA es la esplácnica, formada por fibras simpáticas preganglionares de los nervios esplácnicos que nacen en la médula torácica ipsilateral a cada glándula. La innervación es fundamentalmente colinérgica (Holets & Elde 1982, Appel & Elde 1988) y cada célula recibe de dos a cuatro botones sinápticos (Iijima et al., 1992). Así pues, todos los factores que modulan esta vía activándola o inhibiéndola intervienen en la liberación de CA, como son, por ejemplo, la angiotensina y la histamina.

También es importante el papel que juegan los receptores. Se ha visto que tanto los receptores de histamina como los de angiotensina II, los de ACh, se expresan preferentemente en las células adrenales (Trendelenburg 1954, Choi et al., 1993, Douglas y Poisner 1965, Marley et al., 1989). Además, ciertos estímulos moleculares liberados a la sangre como respuesta a algunas situaciones fisiopatológicas de estrés son capaces de



provocar la secreción de estas glándulas (D. Aunis & K. Langley, 1999), como es el caso de la liberación específica de A ante situaciones de hipoglucemia. Esta hormona actúa sobre diversos órganos diana, produciendo un aumento de la frecuencia cardíaca, vasoconstricción, broncodilatación y aumento del metabolismo. Además, favorece la utilización de glucosa por el tejido adiposo y aumenta la glucemia temporalmente al estimular la gluconeogénesis hepática, inhibir la secreción de insulina y la utilización de glucosa estimulada por la misma (Hall KT et al., 2016).

Existen otras sustancias paracrinas que juegan un papel importante en la regulación de procesos secretores mediados por células neuroendocrinas como, por ejemplo, la liberación de insulina. Este es el caso de las incretinas, hormonas liberadas en el intestino tras la ingesta, que se encargan de facilitar la liberación de insulina en las células beta pancreáticas, reduciendo así la glucemia post-pandrial. Las principales son el GIP producido por las células K del duodeno y yeyuno proximal, y el GLP-1 sintetizado por células L del íleon y el colon. EL GLP-1, a parte de su función hipoglucémica, presenta varias ventajas como son el aumento de insulina, la inhibición de la secreción de glucagón, el vaciado gástrico y la saciedad, acciones que maximizan la absorción de nutrientes al tiempo que limitan el aumento de peso (Drucker DJ,2018).

La exendina-4 (exenatida) es un polipéptido de 39 aminoácidos análogo de la GLP-1, aprobado clínicamente para el tratamiento de la DM2, en concreto, cuando fracasa el tratamiento con metformina. Es el primer mimético de incretina disponible clínicamente con efectos antidiabéticos. Estudios previos reflejan que tiene varias ventajas con respecto a otros tratamientos, como son la pérdida de peso y la disminución del riesgo de provocar hipoglucemias secundarias (John B. Buse et al., 2004). Sin embargo, su utilidad terapéutica es limitada debido a la corta vida media plasmática de 2,4 horas que presenta (Zhong X et al., 2018). Hoy en día, se piensa que la célula beta pancreática no es la única diana de las incretinas, ya que también se han visto implicadas a nivel cognitivo y en enfermedades degenerativas.

Actualmente, se sabe que la liberación de insulina por las células beta pancreáticas está modulada por inervación esplácnica y factores sanguíneos como el nivel de glucemia, mecanismos reguladores que recuerdan a los de la médula adrenal. Por ello, no es

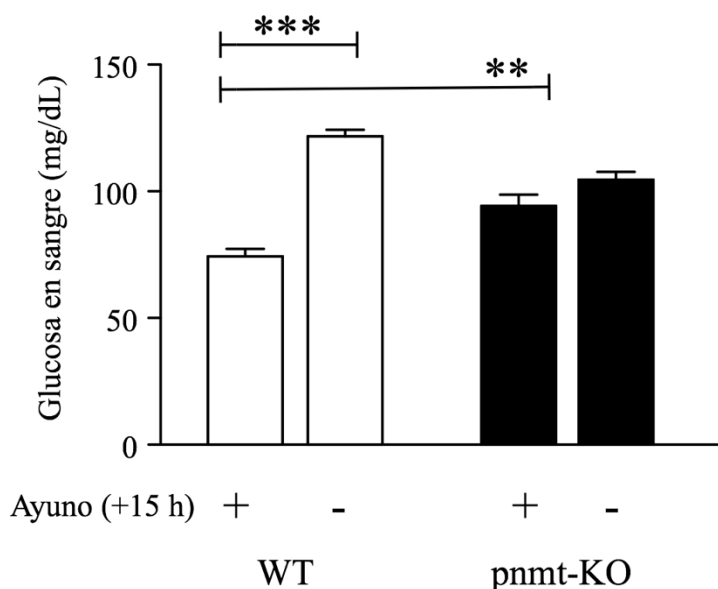
descabellado plantear que el GLP pueda tener también un efecto directo sobre las células adrenales influyendo así en la liberación de A, hecho que hasta ahora se desconoce. Por esta razón, queremos valorar la respuesta hipoglucémica en ratones Pnmt-KO, animales modificados genéticamente que no expresan la enzima PNMT. Dicho de otro modo, estos animales presentan NA, pero no A.

## 2. Hipótesis y Objetivos

### 2.1 Hipótesis

A sabiendas de que nos vemos colaborando en un estudio de investigación ya en vigor, partimos de datos en el laboratorio que indican que las incretinas podrían tener un efecto sobre las células cromafines, pues se ha comprobado que presentan receptores para ellas.

Desde otra perspectiva, datos previos del laboratorio indican que los ratones Pnmt-KO pesan menos (a tres meses de edad 30,2 vs 25,7 g;  $p < 0,001$ , *t*-student) tienen una glucemia basal ligeramente mayor, que no se ve modificada por estados de ayuno o postprandiales, y que responden peor ante los test de tolerancia a la glucosa. Esto se debe a que la distribución de la glucosa en ambos tipos es diferente, aunque todavía se desconoce con exactitud el mecanismo. Se sabe que la A juega un papel importante en la regulación homeostática de la glucosa actuando a diferentes niveles. Por lo tanto, nos preguntamos cómo responderán ante una hipoglucemia secundaria a la administración de insulina, teniendo una certeza del 100% de que no liberarán A.



*Figura 2. Resultados preliminares que nos permiten establecer la hipótesis*

## **2.2 Objetivos**

Mediante la realización de este trabajo se persiguen dos objetivos, uno general relacionado con la asignatura y un objetivo específico propio del trabajo.

### **2.2.1 Objetivo de la asignatura**

Comprender las bases del método científico aplicándolo al diseño y realización de un trabajo de investigación básico. En concreto, la búsqueda de fuentes de información, el empleo de técnicas y procedimientos específicos para la obtención de resultados con consistencia tanto interna como externa y la exposición y defensa, en última instancia, en público de los resultados obtenidos.

### **2.2.2 Objetivos específicos**

Los objetivos de este trabajo realizados exclusivamente por nosotras han sido:

- Caracterizar la respuesta de ratones Pnmt-KO ante una hipoglucemia.
- Distinguir ambas cepas midiendo los niveles de CA de los distintos animales mediante HPLC.
- Comprobar el genotipo de los ratones mediante técnicas de PCR.
- Confirmar *in vivo* la posible asociación entre la exendina y la síntesis de CA.

### **3. Materiales y Métodos**

#### **3.1 Materiales**

Para el desarrollo de este trabajo, se hizo uso de las sustancias nombradas a continuación. Agarosa, DHBA, EDTA, fenol-cloroformo, heptasulfonato sódico, insulina, SDS, tris (Sigma-Aldrich), triton X-100. Exendina (Tocris, UK). Gel Red (Biotium). Complete, proteinasa K (se adquirieron a la compañía Roche Diagnostics, (Mannheim, Germany), glucómetro y tiras reactivas (Accu-Chek, Roche). Todas las sales y reactivos son de grado. Agua milli Q.

#### **3.2 Animales sujetos a experimentación**

Todos los procedimientos con animales se realizaron de acuerdo con las directrices y regulaciones institucionales y nacionales. Los ratones Pnmt-KO se produjeron por la interrupción del locus Pnmt mediante la inserción de la recombinasa Cre en el exón 1, para detalles específicos ver (Ebert et al., 2004). Un par de ratones Pnmt-KO fueron amablemente proporcionados por el Dr. Ebert, y los animales *wild type* (WT) (129x1 / SvJ) fueron obtenidos de Jackson Laboratory (Maine, USA) y criados en nuestro animalario. Para la determinación del genotipo se aisló DNA de todos los animales, a partir de biopsias de cola de ratón, mediante su digestión con proteinasa K y purificación con cloroformo de fenol (Sambrook et al., 1989).

#### **3.3 Test de tolerancia a la insulina**

Para llevar a cabo este experimento, los ratones siguieron un ayuno nocturno de 14 horas. Inicialmente, se cortó 0,3 cm de cola para tomar muestras de sangre y así medir la glucemia usando un glucómetro estándar. A continuación, se inyectó un bolo de insulina por vía intraperitoneal (0,75 UI/kg de peso corporal, en 0,9 % de NaCl). Seguidamente, se tomaron muestras de ~20 µL de sangre de la cola previamente cortada en diferentes momentos (0, 30, 60, 90, 120, 180 y 210 minutos) para la determinación de glucosa en plasma.

### **3.4 Tratamiento con exendina-4 o suero fisiológico**

El tratamiento con exendina-4 o suero fisiológico consistió en la inyección de un bolo intraperitoneal de una de las sustancias en función del animal seleccionado y su peso (por cada 10 g de ratón se inyectó 0,1 ml de solución). La dosis a la que se inyectó la solución con exendina-4 es de 30 nmol/kg.

Previo a esto, se registró la glucemia basal, el peso y la cantidad de comida y agua de cada ratón.

### **3.5 Genotipado de ratones**

#### **3.5.1 Extracción de DNA genómico**

El DNA genómico se obtuvo a partir de 1 cm de cola de cada ratón. Para ello, se llevaron a cabo dos fases: la disgregación del tejido con proteinasa K para obtener DNA libre de proteínas, y la purificación del mismo mediante el método fenol-cloroformo.

Primero, se preparó una solución lisis que contenía proteinasa K, con la que se cubrió cada trozo de cola y se dejó reaccionar a 55 °C durante doce horas. En segundo lugar, se agitó la muestra y se centrifugó. A continuación, se transfirió el sobrenadante a un eppendorf limpio y se mezcló con fenol-cloroformo que al centrifugarse se diferenció en tres capas: una clara (relevante para nuestro estudio), una intermedia (de desecho) y una densa (fenol).

En tercer lugar, se extrajo con cuidado la fase clara y se añadió NaAc para que el DNA precipitara. Se mezcló con etanol absoluto formándose un anillo de DNA que se volvió a centrifugar desechando el sobrenadante. Además, se añadió etanol para hidratarlo y eliminar las sales restantes.

Por último, se centrifugó y se extrajo el sobrenadante nuevamente, obteniendo el DNA purificado. Este se dejó secar y se resuspendió en Agua milli Q a 4 °C. De este modo, se consiguió un DNA listo para ser cuantificado en el Nanodrop conociendo así su concentración y pureza.

### **3.5.2 PCR**

El genotipado se realizó mediante PCR (Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler). Las secuencias del cebador fueron las siguientes:

5'-CAG GCG CCT CAT CCC TCA GCA GCC-3'

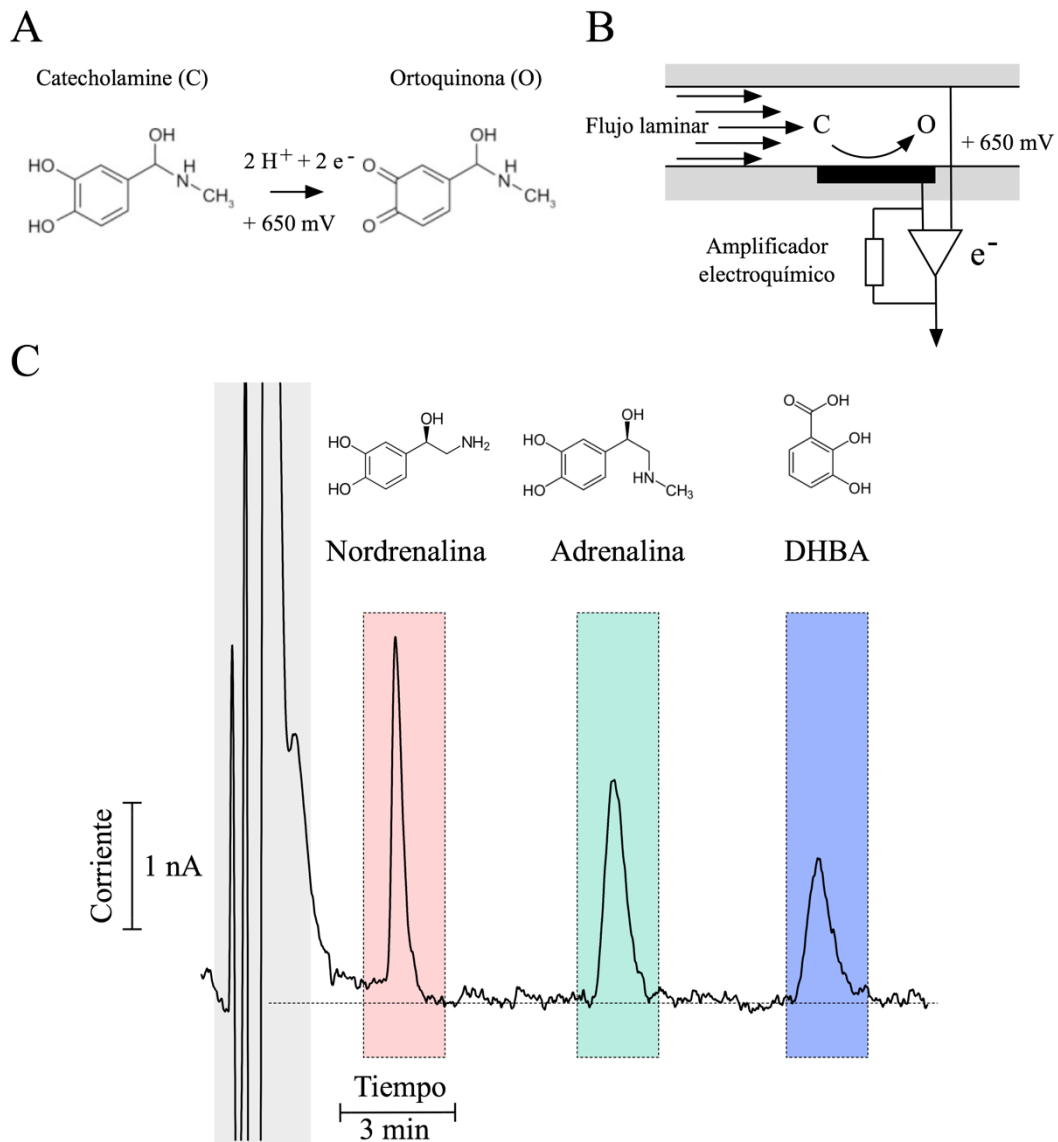
5'-CTG GCC AGC GTC GGA GTC AGG GTC-3' y

5'-GGT GTA CGG TCA GTA AAT TGG ACA CCG TCC TC-3'. (Ebert et al., 2004).

Los productos de amplificación se observaron al estudiar las muestras en gel de agarosa al 2,5 % y los fragmentos esperados fueron de 200 pb del alelo de WT y un fragmento de 160 pb del alelo Pnmt-KO.

### **3.6 Cromatografía líquida de alta resolución y detección electroquímica de CA**

Las médulas suprarrenales (15 de WT y 13 de Pnmt-KO) se trituraron en un tampón de lisis helado que contenía ácido perclórico (0,05 N), Triton X-100 (0,25 %) y el estándar interno DHBA (200 nM). Los homogenizados se centrifugaron y los sobrenadantes se analizaron con HPLC acoplado a detección electroquímica, lo que permitió detectar y cuantificar las diferentes CA (Borges et al., 1986).



*Figura 3. Esquema representativo de la detección de CA por HPLC.*

### 3.7 PCR cuantitativa (qRT-PCR)

En la cuantificación de la expresión del mRNA de TH, en células cromafines de ratón se realizó qPCR utilizando GADPH como gen de referencia y partiendo de una muestra de RNA que fue retrotranscrita a cDNA (qRT-PCR).



En este estudio, la qPCR se realizó con la mezcla *iQ SYBR Green supermix* (Bio-Rad) en un sistema termociclador *Bio-Rad Mini Opticon Real-time PCR*. Las muestras se prepararon por triplicado siguiendo el protocolo que recomienda el fabricante. Los cebadores usados para analizar la expresión de TH y GAPDH fueron los siguientes:

TH *forward*: 5'-CCCCACCTGGAGTATTTTGTG-3'.

TH *reverse*: 5' ATCACGGGCGGACAGTAGACC-3'.

GAPDH qPCR *forward*: 5'-GGAAGCTCACTGGCATGGCCT-3'.

GAPDH qPCR *reverse*: 5'-CGCCTGCTTCACCACCTTCTTG-3'.

### **3.8 Análisis estadístico**

Los datos obtenidos se expresaron como la media  $\pm$  SE. La significación estadística entre los grupos de experimentos se realizó mediante la prueba no paramétrica de *U-Mann Whitney* o la *t* de Student. Las diferencias se consideraron significativas con un valor de  $p < 0.05$ . Los datos se analizaron con el programa Prism (Graphpad Software, San Diego, CA).

#### 4. Resultados y Discusión

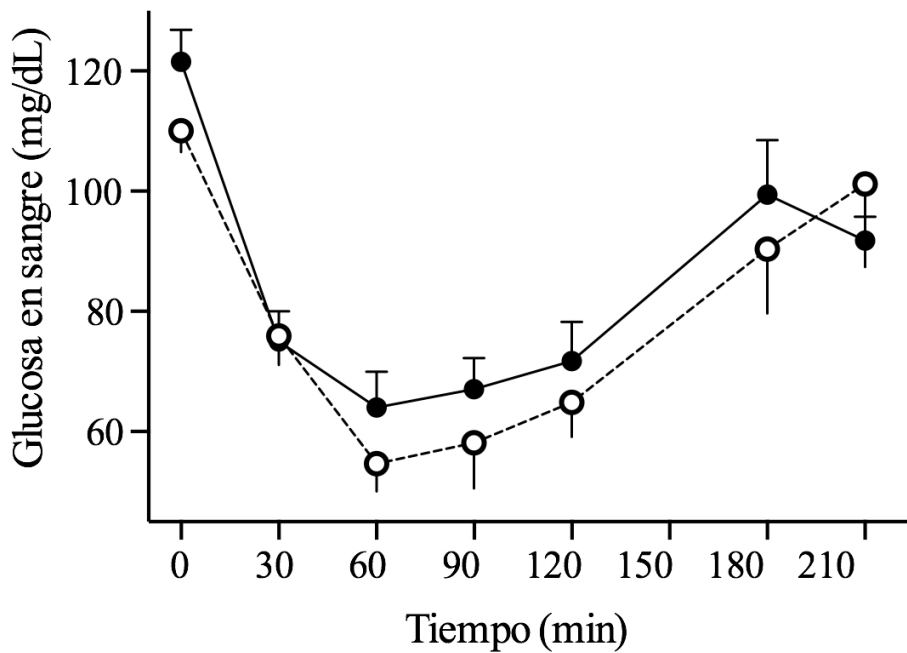
Para realizar este experimento partimos de una muestra de 24 ratones, la mitad WT y la otra Pnmt-KO, tipificados como WT del 1 al 12 y Pnmt-KO del 1 al 12. Ambos tipos son indistinguibles físicamente y por ello, para diferenciarlos, es preciso realizar su genotipado.

Cabe señalar que se ha descrito que en los Pnmt-KO no se ha observado problema alguno respecto a su desarrollo, incluyendo las alteraciones de crecimiento y conducta. No obstante, se ha visto que el peso de los Pnmt-KO a los tres meses de edad es significativamente menor (WT 30 g vs Pnmt-KO 25,5 g;  $p < 0,01$ , t-Student). Asimismo, son capaces de sobrevivir hasta edades adultas cumpliendo sin dificultad sus funciones vitales de nutrición, relación y reproducción.

Lo que principalmente diferencia a los Pnmt-KO de los WT es la carencia de A. Para compensarlo, sintetizan más cantidad de NA, aunque los niveles de CA totales no se llegan a igualar (ver Figura 6B).

Se sabe que la A juega un papel importante en la regulación homeostática de la glucosa actuando a diferentes niveles. Desde otra perspectiva, datos previos del laboratorio indican que los ratones Pnmt-KO tienen una glucemia basal ligeramente mayor (ver figura 2 en la sección de hipótesis) y que responden peor ante los test de tolerancia a la glucosa. Esto se debe a que la distribución de la glucosa en ambos tipos es diferente. Por lo tanto, nos preguntamos cómo responderán ante una hipoglucemia secundaria a la administración de insulina.

Con este objetivo, se realiza un experimento en el que se someten todos los ratones al test de tolerancia a la insulina. En los resultados se observa que la glucemia basal en los dos tipos de ratones, como ya comentado, difiere desde el minuto cero. Los Pnmt-KO tienen aproximadamente 120 mg/dL siendo ligeramente mayor que en los WT con 110 mg/dL. Transcurridos 60 minutos, la glucemia desciende al 50 % manteniéndose la diferencia de 10 mg/dL entre ambos tipos de ratones. Pasado este punto de hipoglucemia hay tendencia al aumento de glucemia.



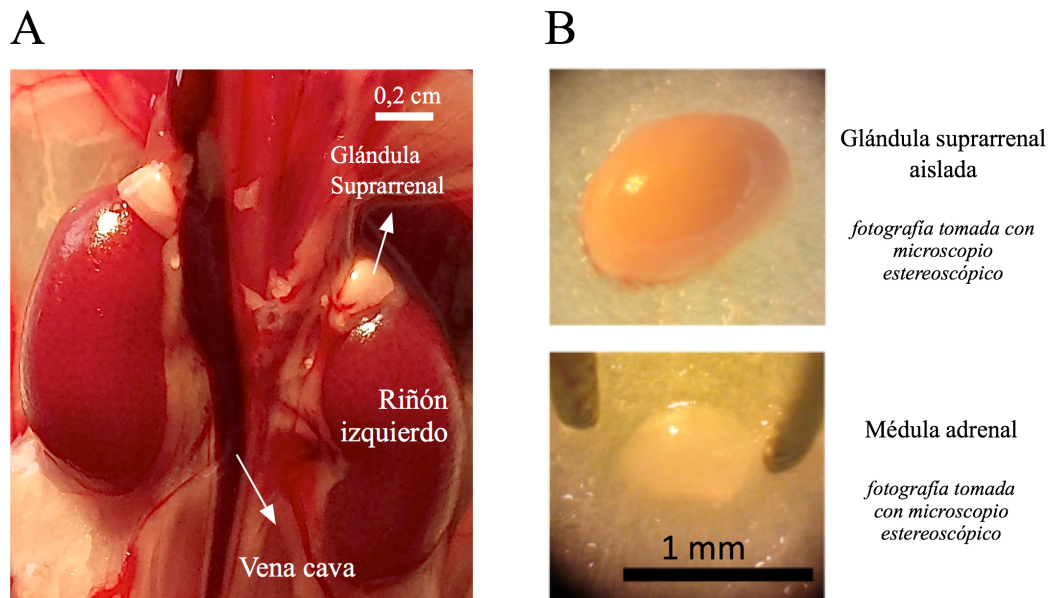
**Figura 4.** Gráfico que muestra el test de tolerancia a la insulina practicado en 12 ratones *Pnmt-KO* (círculos negros) y 12 *WT* (círculos blancos). Los círculos blancos y la línea de puntos se corresponden con interpolación lineal de los *WT* medidos al mismo tiempo que los *Pnmt-KO*, representados con puntos negros y línea continua. Estos datos corresponden con el valor medio experimental de la glucosa en sangre medidos en mg/dL. No existen diferencias significativas en el área bajo la curva.

También, diariamente se obtuvieron medidas del peso de los ratones y su comida, observándose que los *Pnmt-KO* comen un 23 % más pese a pesar menos. Estos datos nos hacen plantearnos su causa. Los *Pnmt-KO* presentan una glucemia más constante, a pesar de comer más y pesar menos, pudiéndose deber a un aumento de su actividad física, hecho aún pendiente de investigar.

Como ya se ha mencionado, se parte de la hipótesis de que la exendina pueda tener algún efecto sobre la médula suprarrenal, una idea ambigua hasta el momento. Hay evidencias en el laboratorio de que la exendina, a nivel celular, tiene efecto sobre la TH estimulando su expresión y aumentando la cantidad de CA, pero ¿pasará lo mismo *in vivo*?

Con el fin de comprobarlo, en una segunda parte del trabajo se realiza un estudio piloto con 8 ratones *WT* y 8 *Pnmt-KO*. A los 4 primeros ratones de cada grupo se les inyecta suero fisiológico y a los restantes exendina. Este procedimiento se lleva a cabo de

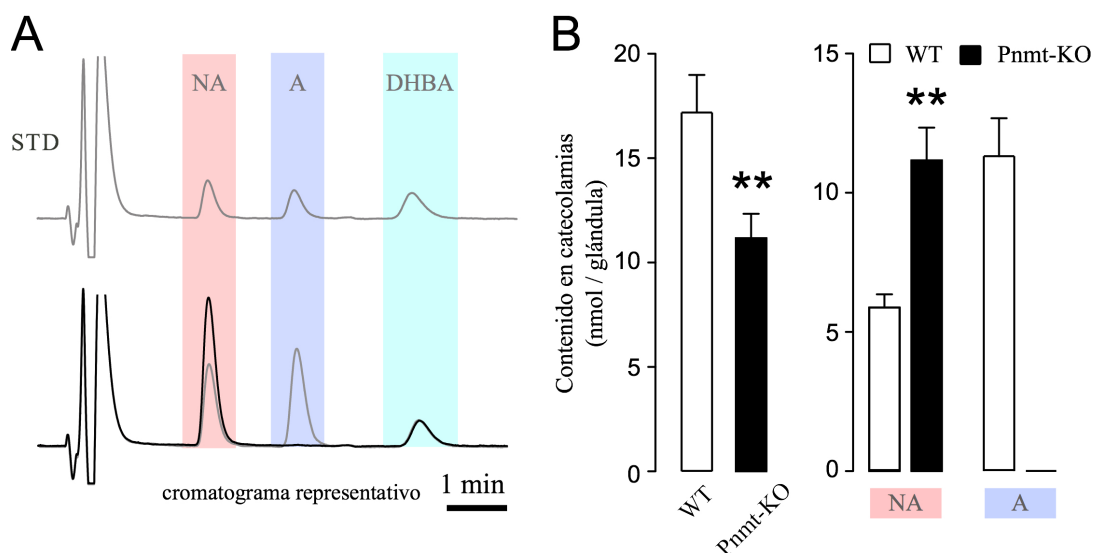
igual modo y en las mismas condiciones durante tres días consecutivos. Es al cuarto día cuando tras medir la glucemia se procede al sacrificio de los 16 animales, para diseccionar sus glándulas suprarrenales bajo microscopio estereoscópico y analizarlas.



**Figura 5. Imágenes que muestran la localización y la composición de las glándulas suprarrenales A) Riñón derecho e izquierdo con sus respectivas glándulas suprarrenales y la vena cava situada medialmente. B) Vista a microscopio estereoscópico de la glándula suprarrenal aislada y de la médula adrenal.**

Las glándulas suprarrenales se clasificaron en dos grupos, uno con las derechas y el otro con las izquierdas. El primero se utilizó para realizar PCR y el segundo para HPLC. Ambas técnicas permitieron confirmar el genotipo de cada animal.

La HPLC, como es de esperar, muestra que la ausencia de Pnmt no permite que las células cromafines sintetizen A. Se aprecia que en los WT se libera A y en menor cuantía NA, mientras que en los Pnmt-KO sólo se libera NA pero en mayor proporción que los WT. Además, en el estudio del contenido de CA totales, se demuestra que la cantidad en los WT es aproximadamente 5 nmol/glándula mayor que en los Pnmt-KO.



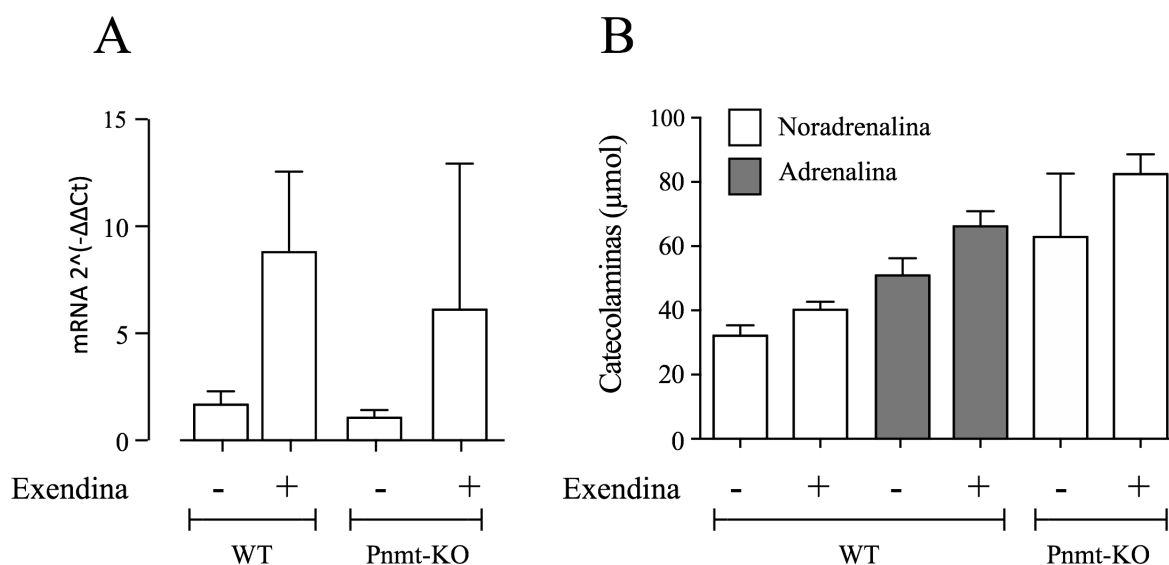
**Figura 6. Los ratones carentes de A tienen un 50 % más de NA. A)** Cromatografía representativa de NA, A y DHBA (STD interno) tanto en WT (línea gris) como en Pnmt-KO (línea negra). **B)** Gráfico que muestra el contenido total de CA en nmol/glándula y de NA y A por separado, en los WT (columna blanca) y en los Pnmt-KO (columna negra). Los resultados se muestran como la media  $\pm$  SD. **\*\*** $p \leq 0,01$ ; t-student.

Estos hechos podrían indicar que el mecanismo de respuesta ante una situación de hipoglucemia no se debe exclusivamente a la liberación de CA. Deben existir otros factores reguladores implicados de manera adicional, ya que como la cantidad de CA es distinta en ambos grupos, se esperaría que respondiesen de forma diferente. Estadísticamente existe diferencia en la secreción de A y NA, pero nos preguntamos si hay diferencia biológica. ¿Qué es más importante, que no tenga A o que tenga más NA?

Asimismo, el aumento extra de NA en los Pnmt-KO podría corresponderse con la NA que no ha sido transformada en A por carecer de PNMT. Esto haría pensar que la cantidad total de CA debería ser la misma en ambos grupos. En contraposición, se cree que como la NA se sintetiza en el interior de las vesículas y la A a nivel citosólico (que después se almacena en vesículas), la NA tiene menor afinidad por las proteínas de anclaje vesicular, saliendo al citosol con mayor facilidad y estando más expuesta a enzimas que pueden destruirla.

En los resultados obtenidos tras el tratamiento con exendina, se objetiva un aumento en la expresión del mRNA de la TH en todos los animales, aunque en menor

medida en los Pnmt-KO. Del mismo modo, también se muestra el contenido aumentado de NA y A en los WT, y de NA en los Pnmt-KO. Sin embargo, cabe destacar que el aumento de CA totales es mayor en los WT que en los Pnmt-KO. Por lo tanto, estas evidencias sugieren indicios de que la exendina sí podría mediar en la liberación de CA *in vivo*.



**Figura 7. La exendina administrada *in vivo*, apunta en una experiencia piloto que se activa el gen de la TH y aumenta las CA de la médula suprarrenal. A) Cantidad de mRNA en ratones WT y Pnmt-KO con (+) y sin (-) tratamiento con exendina. B) Concentración de CA obtenidas tras el tratamiento con exendina en los distintos grupos. En blanco la NA y en gris la A.**

Estos análisis nos hacen pensar que la interacción del análogo incretínico con las CA puede ser uno de los motivos por el que el tratamiento con exendina en humanos no produce tantas fluctuaciones glucémicas durante el día, reduciendo así el número de hipoglucemias graves que sí que producen otros antidiabéticos. Además, podría ser otro de los factores que favorecen la pérdida de peso con este tratamiento.

Para concluir, se recalca que este es un estudio piloto y que los resultados obtenidos son útiles y orientativos en el proceder de una futura investigación. Se ha indagado minuciosamente en los aspectos a mejorar durante el transcurso de este experimento, para así poder afinar la metodología necesaria en el próximo experimento con un mayor tamaño muestral, el cálculo de potencia estadística nos hace replantear un experimento con al menos 10 animales por grupo.

## 6. Conclusiones

Asumiendo que el experimento piloto debe seguir siendo estudiado, podemos concluir que:

1. Los Pnmt-KO tienen niveles de glucosa basales mayores que los WT.
2. Los Pnmt-KO responden de igual modo que los WT ante hipoglucemia.
3. Existe un efecto *in vivo* de la exendina sobre la síntesis de CA.
4. Los Pnmt-KO tienen más cantidad de NA que los WT, pero la cantidad total de CA es menor.
5. El tratamiento con exendina aumenta la cantidad de mRNA de la TH.
6. El tratamiento con exendina aumenta la cantidad de CA, tanto A como NA.
7. Es interesante continuar estudiando los Pnmt-KO por la manera en la que responden a los experimentos.

## **7. Habilidades y Conocimientos Adquiridos Durante la Realización del TFG**

El recorrido de nuestro TFG nos ha servido para poner en una práctica conjunta conocimientos aprendidos durante todos los años de estudio de Medicina, y para profundizar en el conocimiento del área de la investigación.

Colaborar con el equipo de investigadores de Farmacología de la ULL nos ha enriquecido enormemente en el trayecto de nuestra carrera. Destacando así el aprendizaje de la búsqueda de fuentes de información fiables, de las bases del método científico para aplicarlo al diseño y realización de este trabajo de investigación, del empleo de técnicas y procedimientos específicos como HPLC y PCR para obtener resultados con consistencia interna y externa, de cómo llevar a cabo la exposición y defensa del mismo y, por último, del camino acompañado y apoyado por los compañeros que forman parte de este campo multidisciplinar.

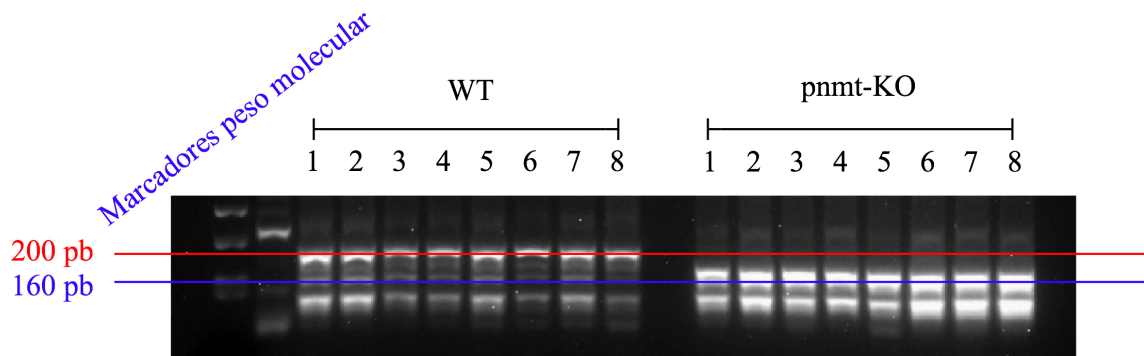


## 8. Bibliografia

- Appel and Elde (1988). The intermediolateral cell column of the thoracic spinal cord is comprised of target-specific subnuclei: evidence from retrograde transport studies and immunohistochemistry. *J. Neurosci.*;8(5):1767-75.
- Aunis D and Langley K., (1999). Physiological aspects of exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla. *Acta Physiol Scand*;167(2):89-97.
- Borges et al., (1986). Continuous monitoring of catecholamine release from perfused cat adrenals. *J Neurosci Methods*;16(4):289-300.
- Chasserot-Golaz *et al.*, (1996) Annexin II in exocytosis: catecholamine secretion requires the translocation of p36 to the subplasmalemmal region in chromaffin cells. *J Cell Biol*;133(6):1217-36.
- Choi AY *et al.*, (1993) Histamine evokes greater increases in phosphatidylinositol metabolism and catecholamine secretion in epinephrine-containing than in norepinephrine-containing chromaffin cells. *J Neurochem*;61(2):541-9.
- Douglas WW and Poisner AM. (1965). Preferential release of adrenaline from the adrenal medulla by muscarine and pilocarpine. *Nature*. 208(5015):1102-3.
- Drucker DJ. (2018) Mechanisms of Action and Therapeutic Application of Glucagon-like Peptide-1. *Cell Metab*.3;27(4):740-756.
- Ebert SN, *et al.*, (2004) Targeted insertion of the Cre-recombinase gene at the phenylethanolamine n-methyltransferase locus: a new model for studying the developmental distribution of adrenergic cells. *Dev Dyn*. Dec;231(4):849-58.
- Gandía L *et al.*, (1998) Human adrenal chromaffin cell calcium channels: drastic current facilitation in cell clusters, but not in isolated cells. *Pflugers Arch*; 436(5):696-704.
- Hall KT *et al.*, (2016) Catechol-O-methyltransferase association with hemoglobinA1c. *Metabolism*;65(7):961-967.
- Holets and Elde (1982). The differential distribution and relationship of serotonergic and peptidergic fibers to sympathoadrenal neurons in the intermediolateral cell column of the rat: a combined retrograde axonal transport and immunofluorescence study. *Neuroscience*;7(5):1155-74.

- Iijima T *et al.*, (1992) Synaptic activation of rat adrenal medulla examined with a large photodiode array in combination with a voltage-sensitive dye. *Neuroscience*;51(1):211-9.
- John B. Buse *et al.*, (2004) Effects of Exenatide (Exendin-4) on Glycemic Control Over 30 Weeks in Sulfonylurea-Treated Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 27:2628-2635.
- Livett *et al.*, (1982) Co-storage of enkephalins and adrenaline in the bovine adrenal medulla. *Neuroscience*;7(5):1323-32.
- Marley *et al.*, (1989) Localization of angiotensin II binding sites in the bovine adrenal medulla using a labelled specific antagonist. *Neuroscience*;28(3):777-87.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory
- Teraoka H *et al.*, (1993) Difference in the effectiveness of Ca<sup>2+</sup> to evoke catecholamine secretion between adrenaline- and noradrenaline-containing cells of bovine adrenal medulla. *J Neurochem*;60(5):1936-40.
- Trendelenburg U. (1954). The action of histamine and pilocarpine on the superior cervical ganglion and the adrenal glands of the cat. *Br J Pharmacol Chemother*;9(4):481-7.
- Zhong X *et al.*, (2018) Engineering a novel protease-based Exendin-4 derivative for type 2 antidiabetic therapeutics. *Eur J Med Chem.* 25; 150:841-850.

## 9. Anexo



*Figura 8 ANEXO. Gel agarosa mostrando el resultado del genotipado. Comprobación experimental de la diferencia genética entre las cepas WT y pnmt-KO.*