

TESIS DOCTORAL

Los receptores CB1 y GPR55
en la fisiología del islote pancreático
y en la fisiopatología de la diabetes tipo 2



Inmaculada Ruz Maldonado

Director: Dr. D. Francisco Javier Bermúdez Silva
Tutor: Prof. Dr. D. Francisco José Alonso Carrión

Programa de Doctorado: Cirugía, Nutrición y Obesidad:
adquisición de capacidades técnicas, de investigación y desarrollo profesional

Facultad de Medicina
Universidad de Málaga

Año 2017

Inmaculada Ruz Maldonado

Tesis Doctoral



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Inmaculada Ruz Maldonado

 <http://orcid.org/0000-0002-2858-8446>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

| **uma.es**

Departamento de Biología Molecular y Bioquímica

TESIS DOCTORAL

LOS RECEPTORES CB1 Y GPR55 EN LA FISIOLOGÍA

DEL ISLOTE PANCREÁTICO Y EN LA

FISIOPATOLOGÍA DE LA DIABETES TIPO 2

**PROGRAMA DE DOCTORADO: CIRUGÍA, NUTRICIÓN Y OBESIDAD:
ADQUISICIÓN DE CAPACIDADES TÉCNICAS, DE INVESTIGACIÓN Y
DESARROLLO PROFESIONAL**

Facultad de Medicina

Inmaculada Ruz Maldonado

Director: Dr. D. Francisco Javier Bermúdez Silva

Tutor académico: Prof. Dr. D. Francisco José Alonso Carrión

Málaga, 2017





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

| uma.es

Departamento de Biología Molecular y Bioquímica

Miguel Ángel Medina Torres

MIGUEL ÁNGEL MEDINA TORRES, Director del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga

INFORMA

que la Tesis Doctoral titulada:

“Los receptores CB1 y GPR55 en la fisiología del islote pancreático y en la fisiopatología de la diabetes tipo 2”

que presenta Dña. INMACULADA RUZ MALDONADO para optar al título de Doctor en Ciencias, ha sido realizada bajo la dirección del Dr. D. FRANCISCO JAVIER BERMÚDEZ SILVA, investigador del Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA-A-013), actuando como tutor académico de la misma el prof. Dr. D. FRANCISCO JOSÉ ALONSO CARRIÓN, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente en Málaga a 17 de abril de 2017.

Fdo. Miguel Ángel Medina Torres





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



FRANCISCO JAVIER BERMÚDEZ SILVA, Doctor en Biología e Investigador
Responsable de IBIMA-Hospital Regional de Málaga,

INFORMA

Que INMACULADA RUZ MALDONADO ha realizado en IBIMA-Hospital Regional de Málaga y bajo mi dirección el presente trabajo de investigación titulado **“Los Receptores CB1 y GPR55 en la Fisiología del Islote Pancreático y en la Fisiopatología de la Diabetes Tipo 2”**, que ha sido objeto de su tesis doctoral, reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor con MENCIÓN EUROPEA, por lo que AUTORIZO de manera expresa su presentación y defensa.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente en Málaga a 17 de abril de 2017.

Fdo. Francisco Javier Bermúdez Silva



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

| **uma.es**

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOQUÍMICA
FACULTAD DE CIENCIAS

Francisco José Alonso Carrión, Catedrático de Biología Molecular y Bioquímica

INFORMA QUE:

He actuado como TUTOR ACADÉMICO de la Tesis Doctoral que con el título:

“Los receptores CB1 y GPR55 en la fisiología del islote pancreático y en la fisiopatología de la diabetes tipo 2”,

ha realizado Dña. INMACULADA RUZ MALDONADO (Licenciada en Biología por la Universidad de Málaga) bajo la supervisión del Dr. D. Francisco Javier Bermúdez Silva, investigador del “Instituto de Investigación Biomédica de Málaga” (IBIMA).

Asimismo informar que en su formato actual, esta Tesis Doctoral, CUMPLE CON TODOS LOS REQUERIMIENTOS EXIGIBLES para ser defendida públicamente y permitir a su autora optar al título de DOCTOR con MENCIÓN EUROPEA, por lo que AUTORIZO de manera expresa su presentación.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente en Málaga a 17 de abril de 2017.

Fdo. Francisco José Alonso Carrión.
(Tutor de la Tesis)

Campus de Teatinos s/n. 29071 Málaga. Tlf. 95 213 19 43 email: fcarrion@uma.es



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



FRANCISCO JAVIER BERMÚDEZ SILVA, Doctor en Biología e Investigador
Responsable de IBIMA-Hospital Regional de Málaga,

INFORMA

Que las publicaciones abajo reseñadas, y de las cuales soy autor de correspondencia, no han sido utilizadas con anterioridad para avalar tesis doctoral alguna.

* Bermúdez-Silva FJ, Romero-Zerbo SY, Haissaguerre M, Ruz-Maldonado I, Lhamyani S, El Bekay R, Tabarin A, Marsicano G, Cota D. Cannabinoid CB1 receptors and mTORC1 signalling pathway interact to modulate glucose homeostasis. *Disease Models & Mechanisms* 2016, Jan; 9(1):51-61.

* Romero-Zerbo SY, Ruz-Maldonado I, Espinosa-Jiménez V, Rafacho A, Gómez-Conde AI, Sánchez- Salido L, Cobo-Vuilleumier N, Gauthier BR, Tinahones FJ, Persaud SJ, Bermúdez-Silva FJ. The cannabinoid ligand LH-21 reduces anxiety and improves glucose handling in diet-induced obese pre- diabetic mice. *Scientific Report* (SREP-16-48498-R1; en segunda revisión).

Y para que conste donde proceda, firmo la presente en Málaga a 17 de abril de 2017.

Fdo. Francisco Javier Bermúdez Silva



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Este trabajo ha sido financiado por el por el proyecto 10/02308 FIS (Fondo de Investigación Sanitaria) del Ministerio de Ciencia e Innovación, y el proyecto PI-0574-2012 de la Consejería de Salud, de la Junta de Andalucía. El Instituto de Salud Carlos III concedió una beca pre-doctoral PFIS FI11/00636 de cuatro años de duración (2011-2015), a la investigadora Dña. Inmaculada Ruz Maldonado. A través de esta misma beca pre-doctoral, se aprobaron dos estancias en centros extranjeros de dos y diez meses de duración (en el Instituto de Investigación Biomédica de la Universidad de Sao Paulo, Brasil, en el grupo del prof. Dr. D. Angelo Rafael Carpinelli y en la Facultad de Ciencias de la Vida y Medicina, en el King's College London, en el grupo del prof. Dr. D. Peter Jones, Diabetes Research Group, respectivamente). En este último centro, también fue concedida una beca de movilidad Albert Renold Travel Fellowship (2015), por la Sociedad Europea del Estudio de la Diabetes (EFSO), con la que se subvencionó parte de los experimentos llevados a cabo en el King's College London. Parte de los resultados y metodologías recogidas en la presente Memoria han dado lugar a las siguientes publicaciones y comunicaciones:

- RUZ-MALDONADO I, Pingitore A, Liu B, Huang GC, Baker D, Bermúdez-Silva FJ, Persaud SJ. **LH-21 and Abn-CBD stimulate insulin secretion and promote β -cell survival in human and mouse islets via GPR55.** (Manuscrito en preparación).
- Romero-Zerbo SY, RUZ-MALDONADO I, Espinosa-Jiménez V, Rafacho A, Gómez-Conde AI, Sánchez-Salido L, Cobo-Vuilleumier N, Gauthier B, Tinahones FJ, Persaud SJ, Bermúdez-Silva FJ. **The cannabinoid ligand LH-21 reduces anxiety and improves glucose handling in diet-induced obese pre-diabetic mice.** (*Scientific Report*, SREP-16-48498-R1; en segunda revisión).
- Bermúdez-Silva FJ, Romero-Zerbo SY, Haissaguerre M, RUZ-MALDONADO I, Lhamyani S, El Bekay R, Tabarin A, Marsicano G, Cota D. **The cannabinoid CB1 receptor and mTORC1 signalling pathways interact to modulate glucose homeostasis in mice.** *Dis Model Mech.* 9 (1):51-61 (2016).
- Romero-Zerbo SY1, García-Gutiérrez MS, Suárez J, Rivera P, RUZ-MALDONADO I, Vida M, Rodríguez de Fonseca F, Manzanares J, Bermúdez-Silva FJ. **Overexpression of cannabinoid CB2 receptor in the brain induces hyperglycaemia and a lean phenotype in adult mice.** *J Neuroendocrinol.* 24 (8):1106-19 (2012).

- RUZ-MALDONADO I, Romero-Zerbo SY, Haissaguerre M, García-Escobar E, Rojo-Martínez G, Soriguer-Escofet F, Cota D, Bermúdez-Silva FJ. **Cannabinoid CB1 Receptor in the Islets of Langerhans could be involved in Alterations of Intracellular Signalling Pathways during Type 2 Diabetes, Contributing to Beta Cell Dysfunction.** Comunicación oral, Mediterranean Foods on Health and Disease. Word Forum For Nutrition Research, Tarragona, Spain, (2013).
- RUZ-MALDONADO I, Pingitore A, Liu B, Huang GC, Baker D, Bermúdez-Silva FJ, Persaud SJ. **Stimulation of insulin secretion by cannabinoid ligands LH-21 and Abn-CBD in mouse and human islets: evaluation of the role of GPR55.** Comunicación oral, Congreso 51st EASD Annual Meeting, Estocolmo, Suecia, (2015).
- RUZ-MALDONADO I, Pingitore A, Liu B, Huang GC, Baker D, Bermúdez-Silva FJ, Persaud SJ. **LH-21 and Abn-CBD stimulate insulin secretion and promote β -cell survival in human and mouse islets via GPR55.** Comunicación oral, Congreso Diabetes UK Professional Conference, Glasgow, Reino Unido, (2016).

“Todas las células del organismo están dirigidas hacia una finalidad: el bien del organismo. Deberíamos aprender de la naturaleza porque todos somos células del gran cuerpo que es la sociedad. Todo lo que sea dar es vida y todo lo que sea egoísmo es muerte”.

Prof. Dr. D. Ignacio Núñez de Castro
Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular (Jubilado)
Universidad de Málaga



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

A MI FAMILIA,

A FRANCIS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral no habría podido ser llevada a cabo sin el apoyo y ayuda inestimable de todas las personas que me han rodeado durante estos años y a las que me gustaría dedicarles estas líneas en señal de agradecimiento:

- Quisiera, ante todo, dar las gracias a mi director, el Dr. Francisco Javier Bermúdez Silva por brindarme la gran oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral en su campo de investigación sobre la Fisiología del islote pancreático, que tanto me fascinó desde un principio. Quisiera agradecerle, también, el haber contado con su aprobación y apoyo a la hora de realizar las dos estancias pre-doctorales que he llevado a cabo durante la realización de la tesis, una en el Instituto de Investigación Biomédica de la Universidad de Sao Paulo (Brasil), y la otra en el “Diabetes Research Group Department” del King's College de Londres (Reino Unido).

- Asimismo, quisiera agradecer al grupo de investigación de Endocrinología y Nutrición, Diabetes y Obesidad del Hospital Universitario Regional de Málaga (Hospital Civil) la amable y cálida acogida que recibí. Desde el primer día que me incorporé como becaria pre-doctoral me hicieron sentir un miembro más de esa sólida y bonita familia liderada por aquel entonces por el Dr. Federico Soriguer Escofet, del que siempre recibí buenos consejos y del que guardo un gratísimo recuerdo. Gracias a “todos” por compartir conmigo no sólo el trabajo sino divertidos desayunos y almuerzos, interesantes seminarios e inolvidables congresos. Al indicar “todos”, me refiero a la Dra. Marisol Ruiz de Adana, la Dra. Gemma Rojo, la Dra. Sonsoles Morcillo, el Dr. Gabriel Olveira, el Dr. Sergio Valdés, la Dra. Yanina Romero, el Dr. Eduardo García, el Dr. Juan Miguel Gómez, la Dra. Natalia Colomo, la Dra. Eva García, la Dra. Sara García, Dra. Elehazara Rubio, Dra. Carolina Gutiérrez, a los estudiantes pre-doctorales Gracia María Martín, Ana María Lago, Vanesa Espinosa y Roberto Monastero, y a las secretarias Raquel J. Muriel y Patricia González. Es posible que me haya olvidado de algún nombre, si es así, disculpad mi descuido, debéis saber que las gracias son también para vosotros/as.

- También quisiera dar las gracias a los miembros del Laboratorio de Medicina Regenerativa del Hospital Universitario Regional de Málaga (Carlos Haya) dirigidos por el Dr. Fernando Rodríguez de Fonseca, por su amabilidad, profesionalidad y el trato recibido, ya que tuve la suerte de compartir laboratorio con ellos el primer año de tesis doctoral (Dr. Fernando Rodríguez de Fonseca, Dra. Elena Baixeras, Dra. Margarita Vida, Dra. Mónica Alonso, Dra. Patricia Rivera, Dr. Sergio Arrabal, Dra. Antonia María Serrano, Dr. Francisco Javier Pavón, Dr. Juan Suárez, Dra. María Jesús Luque, Dr. Eduardo Blanco, técnicos de investigación Ana Luisa Gavito y Antonio Vargas...).

Agradecimientos

- Gracias a los profesores Drs. Curi y Carpinelli y a sus grupos de investigación del Departamento de Fisiología y Biofísica del Instituto de Investigación Biomédica de la Universidad de Sao Paulo (Brasil) por acogerme tan entrañablemente durante dos meses de estancia pre-doctoral. Especialmente quisiera agradecer a la Dra. Laila Romagueira y al Dr. Eduardo Rebelato todo lo que me enseñaron y la extraordinaria ayuda que me brindaron desde el primer día que pisé el laboratorio.

- Dar las gracias muy especialmente, también, al Dr. Alex Rafacho, profesor titular de la Universidad Federal de Santa Catalina en Florianópolis (Brasil), por su sincera y cercana amistad a pesar de la distancia; por transmitirme esa su contagiosa espiritualidad, pasión por la vida y por la ciencia; por animarme siempre buscando argumentos positivos a pesar de las dificultades; y, sobretodo, por enseñarme a ser mejor profesional y con su ejemplo, también, a ser mejor persona.

- Agradecer entrañablemente, también, al profesor Dr. Antonio Jesús Jiménez Lara, mi “Antoñito”, del Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga, por su plena confianza en mí, y el haberme permitido aprovechar su eximia experiencia y sabios conocimientos sobre técnicas histológicas, durante el año anterior a iniciar esta tesis doctoral, cuando me contrató para llevar a cabo, lo que fue, mi primera participación en un proyecto de investigación. Créeme que mucho de lo que a día de hoy haya podido conseguir en el terreno laboral te lo debo a ti y ¡ojalá la vida me devolviese la oportunidad de volver a coincidir contigo delante de un microscopio confocal! Dar las gracias, también, al profesor Dr. Manuel Fernández Fígares, investigador principal del grupo de investigación de Hidrocefalia y al profesor Dr. José Becerra Ratia, jefe del Departamento de Biología Celular, por el apoyo recibido durante ese mi primer año como “investigadora” y por las magníficas clases magistrales que de ellos recibí en mi etapa de estudiante de Biología. Gracias, asimismo, al profesor Dr. Jesús Santamaría, por sus consejos, amistad y por las preciosas y exigentes rutas en bicicleta compartidas; al profesor. Dr. Manuel Marí Beffa, por sus sabias e interesantes charlas sobre epistemología de la ciencia durante tiempos de incubación de experimentos; al profesor Dr. José Antonio Andrades, por sus conocimientos sobre cultivos celulares, su simpatía y sabiduría en destinos viajeros; a la prof. Dra. Leonor Santos, por sus instrucciones sobre cultivos de tejidos primarios, y su cercana colaboración en todo momento. Gracias al personal administrativo, Dña. Ana y D. Ángel, por cuidarme y mimarme tanto y al resto de profesores, investigadores pre- y post-doctorales, técnicos, estudiantes y personal administrativo del Departamento de Biología Celular, que me hicieron tan agradable el día a día en el laboratorio.

- Dar las gracias, también, a profesores, investigadores pre- y post-doctorales, y técnicos del Departamento de Fisiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga. Recuerdo con inmensa alegría cada mañana que tenía que subir a la 4ª

Agradecimientos

planta del módulo de Biología para acceder al laboratorio de cultivos celulares, no sin antes compartir “cienes y cienes” (como diría Sabina) de risas y extraordinarios momentos con el profesor Dr. Juan Pérez, el prof. Dr. Jesús Mateos, el profesor Dr. Manuel Cifuentes, el profesor Dr. Pedro Fernández-Llebréz, el gran Sr. D. José Esteban, la estudiante pre-doctoral Patricia Segado, el Dr. Pablo Granados y Dña. Rosi Llebréz. Gracias por transmitirme tantos conocimientos sobre histología, y por darme la oportunidad de presenciar tan de cerca el trabajo bien hecho.

- Gracias a profesores e investigadores pre- y post-doctorales del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Facultad de Ciencias, que habéis hecho que me sienta como en mi segunda casa en Málaga, donde ha sido escrita una gran parte de esta tesis doctoral. Me gustaría dar las gracias (siempre me faltarán palabras de agradecimiento), al profesor Dr. Francisco José Alonso Carrión (tutor académico de la presente tesis doctoral), por todo lo que me ha enseñado, apoyado y ayudado desde el minuto uno (no sólo infinitos conocimientos, sino inmensos valores) como profesor de Bioquímica durante la carrera de Biología hasta la publicación de esta tesis doctoral, por cómo ha hecho que me expresiese al máximo con su exigencia, perfeccionismo y meticulosidad, por darme tan buenos consejos y, por ayudarme a resolver y buscar soluciones desde la distancia a los múltiples problemas administrativos con los que hemos tenido que lidiar durante todo el complicado proceso de presentación de esta tesis en la Universidad de Málaga. Gracias también al profesor Dr. Javier Márquez Gómez, al profesor Dr. Juan A. Segura Checa, al profesor Dr. Antonio Heredia Bayona, a la profesora Dra. Ana Rodríguez Quesada, al profesor Dr. Ignacio Fajardo Paredes, a la profesora Dra. María Fernanda Suárez Marín así como al Director del Departamento el profesor Dr. Miguel Ángel Medina Torres; gracias, “muchas gracias”, por los ánimos, apoyo y ayuda recibida y por los momentos vividos durante la espera a la lectura y defensa de la tesis doctoral. Gracias también a los investigadores (la mayoría, investigadoras) del grupo de investigación “Cancerómica” del mismo Departamento, por las risas compartidas en la cafetería de Ciencias.

- Agradecer inmensamente al profesor Dr. Peter Jones, a la profesora Dra. Shanta Persaud y a la Dra. Bo Liu por acogerme tan amablemente en su laboratorio de investigación “Diabetes Research Group”, en el King's College London durante mi segunda estancia pre-doctoral de 10 meses de duración. No tengo suficientes palabras para agradecer todo lo que habéis hecho y hacéis por mí día a día, toda la confianza que habéis depositado en mí, todas las horas que me habéis dedicado y seguís dedicando y todo lo que he aprendido y sigo aprendiendo bajo vuestra dirección. Es asombroso contar con vuestro apoyo y disponibilidad día a día. Me considero una privilegiada por la oportunidad que me habéis concedido en el terreno profesional y, con suerte y mucho trabajo, (he puesto todo mi empeño, furia y ahínco en el intento), creo que a partir de ahora las cosas serán un poco más fáciles para mí y

Agradecimientos

podremos recoger los frutos que hemos sembrado juntos. Gracias a los demás miembros del “Diabetes Research Group”, profesores, técnicos, personal administrativo e investigadores pre- y post-doctorales, que desde el minuto uno me hicisteis ver que había entrado a formar parte de una maravillosa familia en Londres, de la que no me quiero separar nunca, a pesar de las inclemencias del tiempo y los desorbitados precios londinenses. Gracias de corazón al Dr. Patricio Atanes (mi Patri) por la cercanía con la que me trató y cuidó desde mi llegada al King's, por ser mi mejor medio de comunicación los primeros meses en Londres, por compartir conmigo tantos buenos y no tan buenos momentos y por querer ayudarme siempre. Gracias al Dr. Attilio Pingitore, por estar dispuesto siempre a ayudar las 24 horas del día, por saber tranquilizarme como nadie antes de una comunicación oral, por ser tan estricto, tan bien hecho e inteligente que haces que lo difícil se haga fácil; cuánto he aprendido y sigo aprendiendo de ti amigo. Gracias al resto de esta gran familia, por hacerme la vida más fácil, gracias a profesionales investigadores pre- y post-doctorales como Anastasia, Tom, Amazon, Ahmed, Sian, Andreia, Zoheb, Ross, Patricia, Elizabeth, Edward, Zara, nuestro formidable manager D. Jai, y a los profesores doctores James, Stefan, Aileen y Gabi.

- Mi agradecimiento a todos mis amigos, muchos de los cuales ya han sido nombrados, por todo el “apoyo psicológico” que me habéis dado para poder completar esta tesis doctoral, así como para tomar buenas decisiones en este campo. Especialmente quisiera dar las gracias a mi grupo de amigas del corazón (mi Patrusca, Caro, Ele y Gracia), mi brillante compi de carrera y sufrimiento pre-Tesis Patri Segado, mi Vane, personal del Estabulario de la Facultad de Medicina de Málaga (que tanto me ayudó durante la tesis y que aún me sigue apoyando a día de hoy con su sincera amistad), mi valiente, luchadora y también bióloga prima Rocío y mis queridas hermanas, fundamentales en mi vida, Marga y Noelia. Gracias por animarme día a día a pesar de tantos kilómetros de por medio. Gracias de corazón a Jose, por abrirme las puertas de su casa en mi segunda aventura en Londres, por apoyarme en esos duros momentos y preocuparse siempre por el estado de mi tesis doctoral.

- Finalmente, quiero agradecer y dedicar esta tesis doctoral a mi familia. En primer lugar, a los dos mejores ejemplos de personas trabajadoras y luchadoras innatas que conozco, a mi abuela María y mi abuelo Antonio. Ellos, a pesar de las muchas “piedras” que la vida les ha puesto en el camino, han sabido siempre reinventarse, han sido el apoyo incondicional de toda la familia, compartiendo y afrontado todos nuestros problemas con valentía y con soluciones positivas. Por eso, y por muchas otras cosas, estoy sumamente orgullosa de mis abuelos, y sus ánimos, han sido claves para terminar esta tesis doctoral. Gracias, de nuevo, abuelos, por inculcarme vuestra educación y por transmitirme vuestro ejemplo de vida. También, cómo no, quiero dar las gracias a mis padres, a mi hermana, a “mi tito nani” y a Emilio. Gracias por entender mi pasión por la ciencia. Aprovecho estas líneas, también, para pedir

Agradecimientos

disculpas por las muchas horas de compañía que no os he podido dedicar. Mamá, yo sé que aunque, por tu enfermedad, no podrás asistir a mi tesis, estarías inmensamente orgullosa de mi. Estoy segura, que el día de la defensa toda tu energía y tus ánimos estarán conmigo. Muchísimas gracias por haberme demostrado desde pequeña todo tu amor, al cual me aferro día a día. Y por último, quiero dar las gracias a la persona que más ha luchado conmigo para que esta tesis sea publicada y terminada, a Francis, mi compañero de vida, por enseñarme tantos conocimientos no sólo en el terreno laboral; por apoyar indiscutiblemente todas mis decisiones, por entenderme, cuidarme, afrontar y superar a mi lado todo los obstáculos que se han presentado a lo largo de todos estos años. Cuánta verdad y sabiduría contenían las palabras que me regaló el ilustre prof. Dr. D. Ignacio Núñez de Castro, muy orgulloso de Francis tras su excelente defensa pública el día de su Cátedra de Bioquímica: “Dña. Inmaculada, usted es una afortunada por tener a Francis en su vida”.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Prefacio

DESCUBRIMIENTO DE LOS ISLOTES DE LANGERHANS Y DE LA INSULINA

A modo de reconocimiento quisiera iniciar la escritura de esta tesis doctoral mencionando, aunque sea someramente, aspectos de la biografía de algunos de los más grandes científicos que contribuyeron a afianzar las bases del estudio fisiopatológico de la diabetes. Sin sus aportaciones, muy probablemente, no habiéramos podido alcanzar el nivel de conocimientos que tenemos en la actualidad sobre esta enfermedad y otras relacionadas.

En primer lugar quisiera destacar la figura de Paul Langerhans, quien en 1869 describió como parte de sus experimentos de doctorado, unos agregados de células de estructura histológica diferente a las ya conocidas células acinares que conformaban, lo que hoy en día es el páncreas endocrino. Su tesis, que llevaba por título "Contribuciones a la anatomía microscópica del páncreas", fue realizada en el laboratorio de los eminentes patólogos Rudolf Virchow y Julius Cohnheim del Instituto Patológico de la Universidad de Berlín (**Fig. 1**).



Figura 1. A la izquierda se expone una **fotografía de Langerhans** cuando era estudiante en la Universidad de Berlín. A la derecha, se muestra la **portada de su tesis doctoral** publicada en febrero de 1869 (Instituto Paul Langerhans, en Dresden, Alemania).

Treinta años después, el francés **Gustave Laguesse** bautizaría con el nombre de islotes de Langerhans (en honor al alemán) a esas agrupaciones celulares que se encuentran dispersas entre los acinos pancreáticos.

A principios del siglo XX, los doctores **Charles Best** y **Frederick Banting** (**Fig. 2**), descubren la insulina y con ello se dió un paso decisivo para el inicio de los tratamientos y la comprensión de la diabetes, enfermedad ya conocida por médicos griegos 2.000 años a.c. y descrita como "una enfermedad en la que se consumen los tejidos y se eliminan por la orina". El 22 de enero de 1921, los doctores Best y Banting inyectaron insulina por primera vez a un muchacho que padecía diabetes. Fue el primero de decenas, y

Prefacio

después de cientos, miles y millones de personas que se han beneficiado de la administración de esta hormona. En 1923, Frederick Banting junto con el profesor **John Macleod**, jefe del departamento de fisiología y del laboratorio donde llevaron a cabo todos sus experimentos, recibían el Premio Nobel de Medicina o Fisiología. Como detalle de generosidad y agradecimiento el Dr. Banting regaló la mitad del importe de este premio al Dr. Best.



Figura 2. Imagen del cirujano ortopeda **Frederick Banting**, el estudiante de medicina **Charles Best**, y un animal de experimentación diabético (Biblioteca Nacional de Medicina de la Universidad de Toronto).

ABREVIATURAS:

- AA: ácido araquidónico
- Ab: anticuerpo
- AC: adenilato ciclasa
- Abn-CBD: abnormal cannabidiol
- ADN: ácido desoxirribonucleico
- ADP: adenosín difosfato
- AEA: anandamida
- Ag: antígeno
- Ag*: antígeno marcado radiactivamente
- 2-AG: 2-araquidonil-glicerol
- AMP: adenosín monofosfato
- cAMP/ AMP_c : cyclic adenosine monophosphate/ adenosín monofosfato cíclico
- AMPK: proteína quinasa activada por AMP
- ANOVA: análisis de la varianza
- Apaf-1: factor activador de la apoptosis
- ARA-S: N-araquindoilserina
- ATP: adenosín trifosfato
- ATF-2: activating transcription factor 2
- AUC: area under the curve (área bajo la curva)
- BCA: ácido bicinconínico
- BMI: body mass index (índice de masa corporal)
- CAT: catalasa

Abreviaturas

- CART: neuropéptido anorexigénico CART (transcripción regulada de cocaína y anfetamina)
- C57BL/6J: C57 black 6
- CB1: receptor cannabinoide CB1
- CB2: receptor cannabinoide CB2
- CBD: cannabidiol
- Cdc42: Cell division control protein 42 homolog
- CEUMA: Comité de ética de la Universidad de Málaga
- CMRL-1066: Medio de cultivo (Connaught Medical Research Laboratories)
- CREB: factor de transcripción CREB (proteína de unión a secuencias del DNA llamadas elementos de respuesta a AMP_c)
- Cpm: cuentas por minuto
- DAG: diacilglicerol
- DGL: diacilglicerol lipasa
- DMSO: dimetilsulfóxido
- DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
- DCCT: Diabetes Control and Complications Trial (estudio acerca del efecto del control de la diabetes y sus complicaciones)
- 4EBPs: 4E-binding proteins (factor de iniciación 4E de la traducción eucariota)
- ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas)
- ERK: quinasa regulada por señales extracelulares
- FAAH: amidohidrolasa de ácidos grasos
- FBS: fetal bovine serum (suero fetal bovino)
- FCS: fetal calf serum (suero fetal bovino)

- FFA: free fatty acid (ácidos grasos libres)
- Fig: figura
- GIP: polipéptido inhibidor gástrico
- Glc: glucosa
- GLP-1: Glucagon-like peptide-1 (péptido similar al glucagón tipo 1)
- GLUT: glucose transporter (proteína transportadora de glucosa)
- GMP_c: guanosín monofosfato cíclico
- GPCR: receptor acoplado a proteína G
- GPR55: receptor GPR55
- GSIS: glucose stimulated insulin secretion (secreción de insulina estimulada por glucosa)
- GSH_{per}: glutatión peroxidasa
- GSH_{red}: glutatión reductasa
- GTP: guanosín trifosfato
- GTT: glucose tolerance test (test de tolerancia a la glucosa)
- HEK293: human embryonic kidney cells 293 (células embrionarias de riñón humano 293)
- HEPES: (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
- 5-HT1A: receptor de serotonina 5-hidroxitriptamina 1 A
- HUVEC: human umbilical vein endothelial cells (células endoteliales de vena umbilical humana)
- IGF1/2: Insulin-Like Growth Factor 1/2 (factor de crecimiento insulínico tipo 1 o 2)
- IMB: índice metabólico basal
- iNOS: óxido nítrico sintasa
- I¹²⁵: isótopo radiactivo yodo-125

- IRS: Insulin receptor substrate (sustrato del receptor de insulina)
- IP₃: inositol 1,4,5-trifosfato
- ITT: insulin tolerance test (test de tolerancia a la insulina)
- IUPHAR: Unión Internacional de Farmacología Básica y Clínica
- K_{ATP}: canales de potasio dependientes de ATP
- KO: knockout
- K_v: canales de K⁺ dependientes de voltaje
- LPI: L- α -lisofosfatidilinositol
- MAGL: monoacilglicerol lipasa
- MAPK: proteína quinasa activada por mitógeno
- MB: unión máxima
- mTORC1: mammalian target of rapamycin complex 1 (complejo 1 de la diana en mamíferos de la rapamicina)
- NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato)
- NAPE: N-acil-fosfatidiletanolamina
- NF- κ b: (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas)
- NSB: unión no específica
- OEA: oleoiletanolamida
- OLEFT: Otsuka Long Evans Tokushima Fatty
- PACAP: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (péptido inhibidor gástrico)
- PBS: phosphate buffered saline (tampón fosfato salino)
- PDK: proteína quinasa dependiente de PIP₃
- PEA: palmitoiletanolamida

- PEG: polietilenglicol
- PHLPP: fosfatasa del dominio PH de proteína de repetición rica en leucina (PH domain Leucine rich protein phosphatase)
- PI3K: fosfoinositol 3 quinasa
- PIP3: fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato
- PKC: proteína quinasa C
- PKB: proteína quinasa B
- PLP: fosfolipasas
- PLC: fosfolipasa C
- PP: polipéptido pancreático
- PP2A: fosfoproteína fosfatasa 2A
- PPAR γ : receptores gamma activados por el factor proliferador de peroxisomas
- PTP1B: Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1 (proteína tirosina fosfatasa 1B)
- Rapa: rapamicina
- Rac1: Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
- RhoA: Ras homolog gene family, member A
- RIA: radioinmunoensayo
- Rimo: rimonabant
- RNAm: ácido ribonucleico mensajero
- RNS: reactive nitrogen species (especies reactivas de nitrógeno)
- ROS: reactive oxygen species (especies reactivas de oxígeno)
- RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium
- RSK: p90 ribosomal S6 kinase
- SEC: sistema endocannabinoide

- SEM: media del error estándar
- SDS: dodecilsulfato sódico
- S6K1: p70 ribosomal protein S6 kinase 1
- SNP: polimorfismo de un solo nucleótido
- SOD: superóxido dismutasa
- SREBP: factor de transcripción sterol regulatory element-binding proteins (proteína de unión al elemento regulador del estero)
- STAT3: factor de transcripción transductor de señal y activador de la transcripción 3
- T: total
- TBS: Tris-buffered saline (tris base salino)
- TBST: Tris-Buffered Saline and Tween 20 (tris base salino con Tween 20)
- Δ^9 -THC: Δ^9 -tetrahidrocannabinol
- TMB: tetrametilbencidina
- TRPV2: receptores vaniloides de tipo 2
- TSC: complejo supresor de tumores
- VAT: tejido adiposo visceral
- VDCC: canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje de tipo L
- Veh: vehículo
- WT: wild type (fenotipo salvaje)

ÍNDICE



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ÍNDICE

ABSTRACT (English).....1-27

CONCLUSIONS.....26

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....29-88

1.1. El islote de Langerhans de humanos y roedores.....31

1.2. Secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS) y control de la secreción hormonal.....37

1.2.1 Primera fase de la GSIS: mecanismo de liberación de insulina dependiente de los canales K_{ATP}39

1.2.2 Segunda fase de la GSIS: mecanismo de liberación de insulina independiente de los canales de K_{ATP}40

1.3. El Ca^{2+} intracelular en la célula β42

1.4. Cascada de señalización de la insulina.....43

1.5. La diabetes tipo 2.....50

1.6. Alteraciones en vías de señalización intracelular del islote pancreático durante la diabetes.....52

1.6.1. Alteraciones de la vía AKT/PKB en diabetes.....52

1.6.2. Alteraciones de la vía AMPK en diabetes.....55

1.6.3. Alteraciones de la vía mTOR en diabetes.....57

1.6.4. Alteraciones de la vía α AMP/CREB en diabetes.....58

1.7. Estrés oxidativo en el islote pancreático y diabetes.....60

1.8. Apoptosis y regulación de la masa de células β en el islote pancreático en diabetes.....66

1.9. El sistema endocannabinoide y el sistema LPI-GPR55 en los islotes pancreáticos.....69



1.9.1. Breve descripción general.....	69
1.9.2. Estudio del receptor cannabinoide CB1; herramientas farmacológicas.....	71
1.9.3. Estudio del receptor GPR55; herramientas farmacológicas.....	74
1.9.4. El receptor CB1 en la fisiología del páncreas endocrino.....	78
1.9.5. El receptor GPR55 en la fisiología del páncreas endocrino.....	80
1.10. CB1 y GPR55 como dianas para tratar la diabetes tipo 2.....	82
1.10.1. El receptor CB1 central <i>versus</i> el receptor CB1 periférico.....	82
1.10.2. El receptor CB1 pancreático en la fisiopatología de la diabetes tipo 2.....	85
1.10.3. El receptor GPR55 pancreático en la fisiopatología de la diabetes tipo 2.....	86
CAPÍTULO II. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO Y OBJETIVOS.....	89-92
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	93-116
3.1. Animales.....	95
3.2. Fármacos.....	96
3.3. Generación y caracterización de un modelo animal de pre-diabetes inducido por una dieta hipercalórica alta en grasa.....	97
3.4. Métodos de aislamiento de islotes pancreáticos de roedores.....	100
3.5. Islotes de Langerhans humanos.....	102
3.6. Protocolo de tratamiento farmacológico <i>in vivo</i> para el análisis de la expresión proteica en islotes pancreáticos.....	102
3.7. Protocolo de tratamiento farmacológico <i>in vitro</i> para el análisis de la expresión proteica en islotes pancreáticos.....	103
3.7.1. Tratamiento <i>in vitro</i> con rimonabant, rapamicina o ambos.....	103
3.7.2. Tratamiento <i>in vitro</i> con LH-21 y Abn-CBD.....	103

3.8. Determinación de la expresión proteica mediante Western blot.....	104
3.9. Medida del Ca ²⁺ intracelular en las células β de los islotes pancreáticos.....	107
3.10. Experimentos <i>in vitro</i> de secreción estática de insulina estimulada por glucosa.....	108
3.11. Determinación de insulina mediante el método ELISA.....	109
3.12. Experimentos <i>in vitro</i> de secreción dinámica de insulina usando un sistema de perfusión.....	109
3.13. Determinación de insulina por radioinmunoensayo.....	111
3.14. Cuantificación de la producción de ROS en islotes tratados con ligandos cannabinoides.....	113
3.14.1. Tratamiento de islotes de rata.....	114
3.14.2. Tratamiento de islotes de ratón.....	114
3.15. Medida de la actividad de las caspasas 3/7 para determinar el nivel de apoptosis.....	115
3.16. Análisis estadísticos.....	116
 CAPÍTULO IV. RESULTADOS.....	 117-164
4.1. Generación y caracterización de un modelo experimental animal de pre-diabetes tipo 2 inducida por dieta.....	119
4.1.1. Curva de ganancia de peso en relación a la dieta consumida.....	119
4.1.2. Test de tolerancia a la glucosa (GTT) y test de tolerancia a la insulina.....	120
4.1.3. Niveles plasmáticos de glucosa y de las hormonas insulina, glucagón y leptina.....	121
4.2. Modulación por los receptores CB1 y GPR55 de la señalización intracelular mediada por glucosa en islotes pancreáticos de ratones y humanos.....	124

4.2.1. Análisis de la expresión de CB1 y GPR55 mediante Western blot en islotes pancreáticos y otros tejidos de ratones C57BL/6J.....	124
4.2.2. Modulación por rimonabant de la expresión del receptor cannabinoide CB1 en islotes pancreáticos de animales sanos y pre-diabéticos.....	124
4.2.3. Análisis mediante Western blot de la vía de señalización Akt/PKB en islotes pancreáticos de ratones C57BL/6J, CD1 y humanos.....	126
4.2.3.1. Vía de señalización Akt/PKB en islotes pancreáticos de ratones.....	126
4.2.3.2. Vía de señalización AKT/PKB en islotes pancreáticos humanos.....	128
4.2.4. Análisis mediante Western blot de la vía de señalización γ AMP/CREB en islotes pancreáticos de ratones C57BL/6J, CD1 y humanos.....	130
4.2.4.1. Vía de señalización γ AMP/CREB en islotes pancreáticos de ratones.....	130
4.2.4.2. Vía de señalización γ AMP/CREB en islotes pancreáticos humanos.....	131
4.2.5. Análisis mediante Western blot de la vía de señalización AMPK en islotes pancreáticos de ratones C57BL/6J, CD1 y humanos.....	134
4.2.5.1. Vía de señalización AMPK en islotes pancreáticos de ratones.....	134
4.2.5.2. Vía de señalización AMPK en islotes pancreáticos humanos.....	135
4.2.6. Análisis mediante Western blot de la vía de señalización mTORC1 en islotes pancreáticos de ratones C57BL/6J.....	138
4.2.6.1. Análisis mediante Western blot de la vía de señalización mTORC1 en islotes pancreáticos de ratones C57BL/6J inyectados con rimonabant.....	138
4.2.6.2. Análisis mediante Western blot de la vía de señalización mTORC1 en islotes pancreáticos de ratones C57BL/6J tratados <i>in vitro</i> con rimonabant y/o rapamicina.....	138
4.3. Modulación de la señal de calcio intracelular dependiente de glucosa por los receptores CB1 y GPR55.....	140

4.3.1. Efectos de LH-21 sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en islotes pancreáticos de ratones C57BL/6J y GPR55 ^{-/-}	140
4.3.2. Efectos de Abn-CBD sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en islotes pancreáticos de ratones C57BL/6J y GPR55 ^{-/-}	140
4.3.3. Efectos de LH-21 sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en islotes pancreáticos humanos.....	140
4.4. Modulación por los receptores CB1 y GPR55 de la secreción de insulina estimulada por glucosa en islotes pancreáticos de ratones y humanos.....	144
4.4.1. Experimentos de secreción estática de insulina.....	144
4.4.1.1. Secreción estática de insulina estimulada por glucosa tras el tratamiento farmacológico de islotes de ratones C57BL/6J sanos y pre-diabéticos con rimonabant, rapamicina o ambos.....	144
4.4.1.2. Secreción estática de insulina estimulada por glucosa tras el tratamiento farmacológico de islotes de ratones C57BL/6J y GPR55 ^{-/-} con LH-21.....	146
4.4.1.3. Secreción estática de insulina estimulada por glucosa tras el tratamiento farmacológico de islotes de ratones C57BL/6J y GPR55 ^{-/-} con Abn-CBD.....	146
4.4.1.4. Secreción estática de insulina estimulada por glucosa tras el tratamiento farmacológico de islotes de ratones ICR e islotes humanos con los ligandos cannabinoides LH-21 y Abn-CBD.....	146
4.4.2. Experimentos de secreción dinámica de insulina.....	150
4.4.2.1. Secreción dinámica de insulina estimulada por glucosa en islotes pancreáticos aislados de ratones C57BL/6J y GPR55 ^{-/-} tratados con LH-21....	150
4.4.2.2. Secreción dinámica de insulina estimulada por glucosa en islotes pancreáticos aislados de ratones C57BL/6J y GPR55 ^{-/-} tratados con Abn-CBD.....	152
4.4.2.3. Secreción dinámica de insulina estimulada por glucosa en islotes humanos tratados con LH-21 y Abn-CBD.....	152
4.5. Modulación por CB1 de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en islotes pancreáticos aislados de ratas Wistar y ratones C57BL/6J.....	155

4.5.1. Producción de ROS en islotes pancreáticos de ratas Wistar tratados <i>in vitro</i> a baja y alta glucosa.....	155
4.5.2. Producción de ROS en islotes pancreáticos de ratas Wistar tratados <i>in vitro</i> con los ligandos cannabinoides ACEA y rimonabant.....	155
4.5.3. Producción de ROS en islotes pancreáticos de ratones C57BL/6J a baja y alta glucosa.....	158
4.5.4. Producción de ROS en islotes pancreáticos de ratones C57BL/6J tratados <i>in vitro</i> con los ligandos cannabinoides ACEA y rimonabant.....	158
4.5.5. Producción de ROS en islotes pancreáticos de ratones C57BL/6J pre-diabéticos y tratados <i>in vitro</i> con rimonabant.....	161
4.6. Modulación por GPR55 de la apoptosis inducida por citoquinas en islotes pancreáticos aislados de ratones C57BL/6J y humanos.....	163
4.6.1. Actividad de caspasas 3/7 en islotes pancreáticos aislados de ratones C57BL/6J y GPR55 ^{-/-} tratados con los ligandos cannabinoides LH-21 y Abn-CBD.....	163
4.6.2. Actividad de caspasas 3/7 en islotes pancreáticos humanos tratados con los ligandos cannabinoides LH-21 y Abn-CBD.....	164
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN.....	165-184
5.1. Expresión y señalización de los receptores CB1 y GPR55 en islotes pancreáticos....	167
5.1.1. Expresión de los receptores CB1 y GPR55 en islotes pancreáticos.....	168
5.1.2. Modulación de las vías intracelulares AKT, CREB y AMPK por CB1.....	169
5.1.3 Modulación de las vías intracelulares AKT, CREB y AMPK por GPR55.....	174
5.2. Receptores CB1 y GPR55 en la secreción de insulina estimulada por glucosa.....	175
5.3. Interacción entre los receptores CB1 y la vía de señalización mTORC1.....	179
5.4. La producción de ROS en islotes pancreáticos y el receptor CB1.....	181
5.5. GPR55 y la supervivencia de la célula β	184
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES.....	187-190
CAPÍTULO VII. BIBLIOGRAFÍA/REFERENCIAS.....	191-239

ABSTRACT



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ABSTRACT**THE ROLES OF CB1 AND GPR55 RECEPTORS IN PANCREATIC ISLETS
PHYSIOLOGY AND PATHOPHYSIOLOGY OF TYPE 2 DIABETES****A.- INTRODUCTION****Basic concepts on islets of Langerhans, insulin production and cellular signalling**

The islets of Langerhans of the pancreas are structures very innervated and well irrigated by blood capillaries whose main function is the regulation of blood glucose homeostasis. Pancreatic islets are formed by 5 cell types: the insulin producing beta (β) cells, the alpha (α) cells that secrete glucagon, the delta (δ) cells secreting somatostatin, the PP cells releasing pancreatic polypeptide and a small group of epsilon (ϵ) cells that secrete ghrelin. The presence of sufficient concentrations of glucose in the capillaries that reach the pancreatic islets triggers the mechanism of insulin release from β -cells. Glucose-stimulated insulin secretion (GSIS), meaning the coupling between the stimulus (glucose) and the secretion (insulin), is a biphasic process characterised by a rapid discharge of membrane-bound insulin granules within the first minutes of the glucose stimulus (first phase), followed by a slow but consistent relocation of vesicles from the cytosol of the β -cells towards the plasma membrane, providing a sustained phase of insulin release (Rorsman *et al.*, 2000). Besides glucose, insulin secretion may also be stimulated by certain amino acids such as alanine (Sener *et Malaise*, 2002) or leucine (Zhou *et al.*, 2010), free fatty acids (FFA), as palmitate and oleate (Itoh *et al.*, 2003; Ferdaoussi *et al.*, 2012), and neurotransmitters such as noradrenaline and certain neuropeptides (Rodríguez-Díaz *et al.*, 2011).

Insulin-mediated signalling affects the activity of tissues that are metabolically active such as the liver, the skeletal muscle, the adipose tissue and the pancreatic islet itself in order to induce the decrease of the plasma glucose levels. These effects are mediated through the insulin tyrosine kinase receptor. Four intracellular signalling pathways, closely interconnected between them are also implicated: Akt/PKB, AMPK, cAMP/CREB and mTOR pathways, respectively (Giorgino *et al.*, 2005; Krook *et Zierath*, 2009; Fritsche *et al.*, 2008; Tatulian, 2015).

The protein kinase Akt (also known PKB), is a serine/threonine kinase that participates in multiple cellular processes such as metabolism (primarily glucose metabolism), apoptosis, angiogenesis, proliferation, transcription and cell migration (Hers *et al.*, 2011). CREB (ϵ -AMP response element-binding) is a transcription factor that binds to DNA sequences known as CRE (ϵ -AMP response elements) regulating the transcription of numerous genes implicated in processes such glucose metabolism, cell survival, and complex neural functions like learning and memory, among others (Dalle *et al.*, 2011). The AMPK (AMP-activated protein kinase), is an enzymatic energy sensor complex that responds to the increase in the AMP/ATP ratio in the cell. Activation of AMPK occurs also through a wide range of metabolic stresses, including the lack of glucose, exercise, hypoxia, ischemia, oxidative and hyperosmotic stresses. mTOR (mammalian target of rapamycin) is the association of two kinase complexes, mTORC1 and mTORC2, belonging to the family of phosphatidylinositol-3 kinase-related kinases (PIKKs). The mTOR complex behaves physiologically as a metabolic sensor that is activated in response to extracellular signals such as nutrients, growth factors and hormones like insulin itself (Howell *et al.*, 2011; Sengupta *et al.*, 2010; Zoncu *et al.* 2011; Balcázar *et al.*, 2009; André *et Cota*, 2012).

Type 2 diabetes is a metabolic disorder characterised by hyperglycemia resulting from the combination of multiple factors among which periferal insulin resistance and the inability of β -cells to produce a sufficient amount of this hormone to maintain normoglycemia have a key role (Bowe *et al.*, 2014). The disease usually begins with the occurrence of peripheral insulin resistance (Kahn *et al.*, 2006; Muoio *et Newgard*, 2008; Pajvani *et Accili*, 2015) to subsequently induce a progressive dysfunction of β -cells (Kahn, 2001), and a clear reduction in their mass (Butler *et al.*, 2003; Deng *et al.*, 2004). In spite of that, it has been estimated that only 15-20% of the individuals with chronic resistance to insulin develop type 2 diabetes (Butler *et al.*, 2003; Dons *et al.*, 2004; Polonsky, 2000). Type 2 diabetes affects areas like the central nervous system (increasing the risk of cognitive dysfunction and dementia), the cardiovascular system (inducing ischemic heart disease and stroke); the eye (being the largest cause of non-traumatic blindness) and the kidneys (causing kidney failure). The disease also displays a genetic component, resulting from the combination of environmental factors (sedentary lifestyle, diet...) and genetic susceptibility to the development of obesity and/or diabetes itself.

Akt-mediated signalling plays a central role in the uptake of glucose by metabolically active tissues that respond to insulin, such as the muscle and the adipose tissues,

facilitating the translocation of GLUTs from the cytosol to the plasma membrane. Moreover, Akt-mediated signalling, inhibits hepatic gluconeogenesis, in the presence of insulin (Steinberg *et al.*, 2009). Due to its crucial role in glucose and lipid metabolism alterations to the Akt signalling pathway contribute to the pathophysiology of diabetes. The Akt-mediated signalling is usually down-regulated in type 2 diabetes with; elevated levels of circulating free fatty acids (FFA), pro-inflammatory cytokines or hormones like leptin have been implicated (Le Marchand-Brustel *et al.*, 2003; Hay, 2011). Additionally, Akt positively regulates the activity of the transcription factor CREB, through its direct phosphorylation (Du *et al.*, 1998) which in turns induces the recruitment of accessory proteins that are necessary for the transcription of genes maintaining cell survival, such as *bcl-2* and *mcl-1* (Nicholson *et al.*, 2002; Inoki *et al.*, 2002; Kovacina *et al.*, 2003).

The ability of the agonists of the GLP-1 receptor to protect β -cells from apoptosis through a α AMP-dependent mechanism in animal models of diabetes (Drucker, 2003) led to hypothesise that the transcription factor CREB might be involved in regulation of pro-apoptotic genes and/or cell survival in the β -cell. Thus, numerous authors have demonstrated that CREB promotes the survival of pancreatic islets, inducing antiapoptotic genes or protein kinases that favour cell proliferation. CREB also collaborates to the maintenance of the homeostasis of glucose, potentiating insulin secretion, and its expression is altered in type 2 diabetes (Jhala *et al.*, 2003; Persaud *et al.*, 2011; Costes *et al.*, 2009). Several studies indicate that CREB has a sequence in its primary structure that is recognized by the proteasome-ubiquitin complex, which mediates its degradation in the β -cell under conditions of glucotoxicity. This limits the post-transcriptional anti-apoptotic activities, enhances glucose sensitivity, and the transcription of those control genes involved in glucose biosynthesis and insulin secretion (Costes *et al.*, 2009).

Due to the evidence that the activity of AMPK is decreased in type 2 diabetes (Ruderman *et al.*, 2004; Bandyopadhyay *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2012) this kinase is considered a therapeutic target for treating type 2 diabetes with several AMPK activators that are used clinically to improve insulin sensitivity (Coughlan *et al.*, 2014).

As discussed above, mTORC1 is a metabolic sensor that is activated from extracellular signals such as growth factors, hormones and nutrients. It also increases the islet mass and stimulates the β -cells mass in those physiological situations that demand it, as is the case of hyperglycemia and insulin resistance. Glucose acts as a potent stimulator of the β -cell mass through mTORC1 activity in rodents *in vivo* (Bernard *et al.*

al., 1998; Bonner-Weir *et al.*, 1989; Paris *et al.* 2003; Topp *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2015), and in β -cell lines (Gómez *et al.*, 2004; Kwon *et al.*, 2004; Bartolomé *et al.*, 2010). However, it is noteworthy to indicate that the hyperstimulation of mTORC1, could lead to the overactivation of its target S6K1, for example by excessive nutrient consumption (Cota *et al.*, 2008; Woods *et al.*, 2008). This would lead to a negative feedback on IRS, causing a decrease in signalling through the insulin receptor and contributing to insulin resistance and endoplasmic reticulum stress. These conditions trigger β -cell dysfunction and progression to diabetes (Elghazi *et al.*, 2010; Umco *et al.*, 2004; Ozcan *et al.*, 2008; Bartolomé *et al.*, 2014).

Oxidative stress in pancreatic islets and diabetes

Cellular oxidative stress results from the imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS) and/or reactive nitrogen species (RNS) and their neutralization by the cellular redox buffers and the antioxidant systems (such as the enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione reductase (GSHred) or glutathione peroxidase (GSHper)) when the latter are not sufficient to control the excess of ROS produced. ROS such as superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radicals (OH^{\cdot}), and reactive nitrogen species (RNS) such as nitric oxide (NO^{\cdot}) and peroxynitrite ($ONOO^{\cdot}$), are molecules that can cause dysfunction and cell death by alteration of metabolic pathways when in excess (Newsholme *et al.*, 2007 and 2009). They also cause damage to cell membranes and important molecules such as DNA, proteins, etc. (Boveris *et al.*, 1972; Turrens 1997; Jonhson *et al.*, 1999; Chandra *et al.*, 2000; Limon-Pacheco *et Gonsebatt*, 2009).

The principal sources of ROS in the cells are the mitochondrial complexes I, III and IV of the electron transport chain (NADH-ubiquinone oxidoreductase, reduced ubiquinone-cytochrome c reductase, and cytochrome c oxidase, respectively), and the enzymatic complex of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NADPH oxidase). All these systems have been described in pancreatic β -cells. Mitochondrial oxidative damage caused by ROS can increase the tendency of mitochondria to release cytochrome c into the cytosol through the permeabilisation of the mitochondrial outer membrane (MOMP) and therefore triggering the cell's apoptotic machinery.

Elevated levels of glucose and/or circulating lipids, i.e, glucotoxic or lipotoxic concentrations associated with type 2 diabetes, induce oxidative stress in different cell types, including pancreatic islets (Newsholme *et al.*, 2007; Keane *et al.*, 2015, Janikiewicz *et al.*, 2015). It is worth to mention that the β -cell has a weak anti-oxidant defense system and a low capacity to buffer the excess of ROS. In spite of that, pancreatic islets have an active defense system against the excess of ROS, constituted by enzymes such as peroxidase, glutaredoxin and thioredoxin (Ivarsson *et al.*, 2005), and a buffer redox system consisting primarily of glutathione, a molecule present at millimolar concentrations in the cell and which is maintained in its reduced state (GSH) by the glutathione reductase. Recent studies have found also a marked decrease in ROS induced by glucose in β -cells that has been linked to increased activity of the pentose phosphate pathway and insulin secretion (Lanzen, 2008). In situations of higher oxidative stress, however, these anti-oxidant systems might result insufficient, leading to cell death, with a consequent impairment of the GSIS. ROS is also able to induce pathways of intracellular signalling. For example, the production of ROS induces by cytokines promotes the expression of the iNOS (inducible- Nitric Oxide Synthase), increasing NO release and the translocation of NF κ B to the nucleus (Liu *et al.*, 2014). In turns, NF κ B induces the expression of the NADPH oxidase allowing this enzyme to become the main source of cytosolic ROS.

NADPH oxidase was first described in phagocytes where it is involved in the elimination of pathogens, although it is also present in other cell types, including β -cells. The activity of the NADPH oxidase is related to β -cell dysfunction as demonstrated by studies in pancreatic islets from animal models of type 2 diabetes and human diabetic subjects, where the expression and activity of this enzyme is altered. Thus, it has been reported that in OLETF (Otsuka Long Evans Tokushima Fatty) rats and in *db/db* mice, the catalytic components of this enzyme complex are overexpressed (Nakayama *et al.*, 2005). Similarly, the levels of mRNAs encoding the catalytic subunits of the NADPH oxidase complex were clearly increased in islets isolated from humans suffering of type 2 diabetes (Marchetti *et al.*, 1998).

ROS generated in the cytosol of β -cells by the NADPH oxidase and those produced by the mitochondrial metabolism, contribute to regulate insulin secretion and cell integrity (Uchizono *et al.* 2006; Imoto *et al.*, 2008). All these observations lead to the hypothesis that the molecular design and the pharmacological use of specific inhibitors of the NADPH oxidase could be useful to reduce ROS and RNS, constituting a new therapeutic strategy for the treatment of type 2 diabetes.

Apoptosis and regulation of the β -cell mass in the pancreatic islet during diabetes

As it is very well known, apoptosis or programmed cell death, is a physiological mechanism, crucial for the maintenance of tissue homeostasis. The size of the pancreatic β -cell mass is maintained through a fine balance between the rate of cell replication and apoptosis as the rate of neogenesis in the adult human pancreas is considered insignificant compared to rodents (Finegood *et al.*, 1995; Bonner-Weir, 2000). A decrease in the rate of replication or an increase in apoptosis would cause a severe deficit in the β -cell mass of the human pancreatic islets.

The decrease in the β -cell mass observed in type 2 diabetes is probably due to an increase in the pro-apoptotic activity in these cells (Butler *et al.*, 2003; Bouwens *et al.*, 2005; Oh, 2015) whose prevention could therefore have therapeutic benefits. Among the mechanisms involved in the development of the apoptotic β -cell process, the glycotoxic and lipotoxicity phenomena (Wali *et al.*, 2014; Del Guerra *et al.*, 2005; Biden *et al.*, 2014), the accumulation of amyloid oligomers (Janson *et al.*, 1999) and inflammatory factors (Maedler *et al.*, 2002) play a very relevant role.

The endocannabinoid system and the LPI-GPR55 system

The endocannabinoid system (ECS) is an intercellular communication network that regulates several homeostatic processes, including energy balance, lipid and carbohydrate metabolism (Osei-Hyiaman *et al.*, 2005; Pagotto *et al.*, 2006; Cota, 2007; Di Marzo, 2009; De Petrocellis *et al.*, 2009; Gatta-Cherifi *et al.*, 2015; Gruden *et al.*, 2015). The ECS consists of three types of molecular components: i) the cannabinoid G-protein coupled receptors (CB1 and CB2); ii) the cannabinoid ligands or endocannabinoids (anandamide (AEA) and 2-arachidonyl glycerol (2-AG)), and iii) the enzymes responsible for the synthesis and the degradation of these compounds.

The expression of CB1 is especially intense in the brain, where it regulates processes such as appetite, satiety, body temperature, locomotion and mood but it has also been identified in peripheral tissues such as liver, skeletal muscle, intestinal tract, adipose tissue and the endocrine pancreas (Osei-Hyiaman *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005; Massa *et al.*, 2005; Juan-Picó *et al.*, 2006; Cota, 2007; Bermúdez-Silva *et al.*, 2007; De Petrocellis *et al.*, 2007; Bermúdez-Silva *et al.*, 2008; Nakata *et al.*, 2008; Starowicz *et al.*, 2008; Tharp *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011). The CB2 receptor is mainly localised in cells of the immune system, such as macrophages, B lymphocytes and NK

cells. CB2 is also expressed in the central nervous system (Van *et al.*, 2005) and other brain regions (Skaper *et al.*, 1996; Nuñez *et al.*, 2004), as well as in tissues such lungs, spleens, liver, adipose, skeletal muscle and the endocrine pancreas (Howlett *et al.*, 2002; Mallat *et al.*, 2006; Juan-Picó *et al.*, 2006; Cavuoto *et al.*, 2007; Bermúdez-Silva *et al.*, 2008; Nakata *et al.*, 2008; Starowicz *et al.*, 2008; Tharp *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011).

Despite being initially considered as the third cannabinoid receptor (CB3) there is a significant controversy to include the GPR55 receptor as a member of the SEC. There are a number of compelling reasons for this; for example, GPR55 only shares a 14% of homology with CB1 and CB2 (Baker *et al.*, 2006), and lacks of the binding site typical of the cannabinoids (Kotsikorou *et al.* 2011). On the other hand, GPR55 belongs to the δ group of class A GPCRs while CB1 and CB2 belong to the α subfamily. Although GPR55 is pharmacologically responsive to cannabinoids, its proper endogenous ligand seems to be the lysophospholipid 1- α -lysophosphatidylinositol (LPI), (Oka *et al.*, 2007) or a related compound, the 2-Arachidonyl-LPI (Oka *et al.*, 2009). Therefore, with the current state of knowledge, it seems more appropriate to consider the LPI-GPR55 system as an independent signalling system, with molecular connections to the SEC.

In addition to the brain, GPR55 is also expressed in peripheral tissues of humans, mice, and rats such as in spleen, adrenal glands and bone (Sawzdargo *et al.*, 1999; Ryberg *et al.*, 2007; Whyte *et al.*, 2009) as well as in metabolically relevant tissues such as the adipose tissue (Moreno-Navarrete *et al.*, 2012), the gastrointestinal tract (Ryberg *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2011; Schicho *et al.*, 2011), the liver (Sawzdargo *et al.*, 1999; Romero-Zerbo *et al.*, 2011; Moreno-Navarrete *et al.*, 2012), the skeletal muscle (Simcocks *et al.*, 2014), and the pancreatic islets. The latter are the subject of the present study.

Pharmacological tools to study the CB1 and GPR55 receptors

The CB1 receptor is coupled to heterotrimer $G_{i/o}$ (inhibitory) proteins, which promote inhibition of adenylate cyclase, the activation of K^+ channels, as well as the mitogen-activated protein kinases (MAPKs) (Howlett *et al.*, 1990; Demut *et al.*, 2006; Fonseca *et al.*, 2013) and the PI3K/PDK/PKB kinase pathways (Gómez del Pulgar *et al.*, 2000; Blázquez *et al.*, 2015). In addition, CB1 couples through $\beta\gamma$ dimer of $G_{i/o}$ to

other effectors such as voltage-sensitive Ca^{2+} channels and K^+ channels. Indeed there's not a consensus on the effects of the activation of the cannabinoid receptors in terms of intracellular concentration of Ca^{2+} as some piece of work state they reduce the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ through the closure of voltage-dependent Ca^{2+} channels in neuronal cells (Mackie *et al.*, 1992); contradictorily, it has also been argued that cannabinoids could induce transient elevations of intracellular Ca^{2+} (Sugiura *et al.*, 1996).

There is a large group of compounds available for the study of the cannabinoid receptors, most of which behaving as agonists or antagonists. In this doctoral thesis we have used the following: a) Rimonabant (SR141716A), was the first selective blocker of CB1 to be approved for pharmacological use almost anywhere in the world (Rinaldi-Carmona *et al.*, 1994; Pertwee, 1997; Sun *et al.*, 2012); b) LH-21, a molecule identified as a neutral antagonist of CB1 in both *in vitro* and *in vivo* experiments, and c) ACEA, a synthetic analogue of the endogenous cannabinoid ligand AEA.

GPR55 is a GPCR associated with $\text{G}\alpha_{13}$ (Ryberg *et al.*, 2007; Henstridge *et al.*, 2009; Lauckner *et al.*, 2008; Whyara *et al.*, 2009) and $\text{G}\alpha_q$ protein subunits (Lauckner *et al.*, 2008). A large number of cannabinoid ligands have been identified as able to interact with GPR55 (Pertwee *et al.*, 2010). There are studies suggesting that AEA and 2-AG are GPR55 agonists (Rybert *et al.*, 2007; Lauckner *et al.*, 2008; Waldeck-Weiermair *et al.*, 2008; Henstridge *et al.*, 2009), but there is little evidence for considering AEA or 2-AG as ligands of GPR55 (Pertwee *et al.*, 2010). Other synthetic cannabinoids such as rimonabant could also activate GPR55. In fact, rimonabant-dependent activation of GPR55 could be at the basis of the therapeutic effects associated with this cannabinoid ligand in obesity (Kapur *et al.*, 2009; Yin *et al.*, 2009; Henstridge *et al.*, 2010).

As it has been supported by numerous studies the Cannabidiol (CBD) appears to behave as a GPR55 antagonist (Ryberg *et al.*, 2007; Lauckner *et al.*, 2008; Whyte *et al.*, 2009). On the contrary, other synthetic ligands such as O-1602 or Abnormal cannabidiol (Abn-CBD), analogous to CBD, are considered the most selective synthetic GPR55 agonists (Johns *et al.*, 2007; Ryberg *et al.*, 2007; Waldeck-Weiermair *et al.*, 2008; Romero-Zerbo *et al.*, 2011; Godlewski *et al.*, 2009; Whyte *et al.*, 2009; Mckillop *et al.*, 2013). Abn-CBD is an atypical cannabinoid because it shows no affinity for the cannabinoid receptors CB1 and CB2. This compound has been used in this doctoral thesis.

CB1 receptor in the physiology of the endocrine pancreas

Given the role of the endocrine pancreas and the endocannabinoid system in the energetic homeostasis, the involvement of this signalling network in the regulation of insulin secretion has been object of studies in recent years. At present, the literature on the expression and function of the cannabinoid receptors in the islets of Langerhans is confusing and somehow contradictory. However, it does seem to be established, that CB1 is expressed in pancreatic islets having capacity to modulate insulin secretion (Bermúdez-Silva *et al.*, 2008; Persaud *et al.*, 2012), although the mechanisms behind this process are not completely understood. Hence, part of the aims of this thesis focuses on the study of the intracellular signalling downstream to CB1. A recent study suggests that activation of CB1 can recruit Akt and ERK1/2 to activate FAK and promote the formation of focal adhesion plaques that would allow the release of the insulin vesicles corresponding to the second phase secretory pool (Malenczyk *et al.*, 2013). On the other hand, studies carried out by our group, and recently published (Bermúdez-Silva *et al.*, 2016), indicate that the modulation of insulin secretion by CB1 requires a functional mTORC1 pathway. It has also been shown that the activation of CB1 inhibits the signalling through the insulin receptor, modulating the activity of the IR/IRS2/Akt pathway, which favours survival and proliferation of the β -cell (Kim *et al.*, 2011).

CB1 has been implicated in the production of ROS in cell types, such as neurons, (Ma *et al.*, 2015; Palomba *et al.*, 2015) but no information is available about the role played by CB1 in the production of ROS, in β -cells. Therefore the investigation of the production of ROS mediated by CB1 in pancreatic islets is another aim of this doctoral thesis.

GPR55 receptor in the physiology of the endocrine pancreas

The expression of GPR55 has been identified at the level of mRNA and protein in rat and mouse β -cell lines (BRIN-BD11 and MIN6 respectively) and in rat, mouse and human pancreatic islets (Romero-Zerbo *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011; McKillop *et al.*, 2013). Experiments of immunohistochemistry indicate that GPR55 is expressed in the β -cells of mouse and rat islets (Romero-Zerbo *et al.*, 2011), suggesting a physiological role in the control of insulin secretion. Our research group reported also that O-1602, a GPR55 agonist, potentiates GSIS in rat and mouse islets. This effect was

abolished in GPR55^{-/-} (KO) mice, showing that the effect was specific for GPR55 (Romero-Zerbo *et al.*, 2011). Subsequently, other authors have demonstrated that GPR55 agonists (AM251, O-1602, Abn-CBD and the acetyleanolamides OEA and PEA) stimulate insulin secretion in islets of mouse and BRIN-BD11 cells (McKillop *et al.*, 2013).

It is known that elevations in $[Ca^{2+}]_i$ are important in the transduction of the stimulatory effects of GPR55 agonists. Thus O-1602 induced transient elevations of $[Ca^{2+}]_i$ in rat islets (Romero-Zerbo *et al.*, 2011) and AM251, O-1602, Abn-CBD, OEA and PEA also caused rapid increases in Ca^{2+} flux in MIN6 and BRIN-BD11 cell lines (Ning *et al.*, 2008; McKillop *et al.*, 2013). GPR55-mediated activation of PLC can occur by the classic $G\alpha_q$ pathway but also by $G\alpha_{13}$, as suggested by the work of Liu *et al.* (Liu *et al.*, 2014), since this subunit has been identified in islets (Skoglund *et al.*, 1999; Hammar *et al.*, 2009). In accordance with the above, it could be suggested that LPI, acting on GPR55, could promote insulin secretion in pancreatic islets. There is also evidence that GPR55 may play a role in β -cell survival since islets of GPR55^{-/-} mice were significantly more susceptible to apoptosis than the islets of WT mice (Liu *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014).

Pancreatic CB1 receptor in the physiopathology of type 2 diabetes

Animals fed a high fat diet show a dysregulation of the endocannabinoid system and elevated levels of endocannabinoids in plasma (Matias *et al.*, 2006; Starowsky *et al.*, 2008). This high endocannabinoid tone elevates plasma insulin concentration, thereby increasing the hyperglycemic effects caused by peripheral resistance to insulin (Di Marzo, 2008). In this regard, blockade of CB1 receptors with rimonabant in isolated islets of obese and diabetic Zucker rats showed a decrease in basal insulin secretion (Getty-Kaushik *et al.*, 2009). In addition, the aforementioned CB1 blockade prevents hyperinsulinemia and protects against the loss of β -cell mass in chronically treated diabetic rats (Duvivier *et al.*, 2009). In another study, diet-induced obese Wistar rats were treated with an organic extract of cannabis, observing a decrease in animal weight and a protection of β -cells from the negative effects caused by obesity (Levendal *et al.*, 2012). Although it is not possible to determine for sure which components of the extract were responsible for the registered effects, the high levels of CB1 in these animals suggest a blockade of the signalling through CB1 (Levendal *et al.*, 2012).

It is also important to highlight the role of macrophages that infiltrate the pancreatic islets in the insurgence of diabetes and its progression. Thus, the modulation exerted by the endocannabinoids through the CB1 receptor expressed in macrophages seems to be very relevant in the inflammatory phenomena leading to β -cell failure during type 2 diabetes (Jourdan *et al.*, 2013).

Taken together, all these results suggest an important role for the pancreatic CB1 receptor in the pathophysiological processes of type 2 diabetes.

Pancreatic GPR55 receptor in the physiopathology of type 2 diabetes

The role played by GPR55 in the physiopathological changes occurring during type 2 diabetes is still unknown; similarly, the potential therapeutic intervention through this receptor to ameliorate the diabetic conditions is not completely clear.

Unfortunately, there are no studies investigating possible changes in the expression or the signalling through this pathway in animal models of diabetes, or diabetic individuals, nor any studies exist linking GPR55 with pathophysiological conditions of pancreatic islets such as hyperinsulinemia, intra-islet inflammation, oxidative stress or β -cell apoptosis and islet mass reduction. However, it is worth to note that, it is possible that some of the beneficial effects assigned to the blockade CB1 are mediated at least in a part by GPR55 as certain cannabinoid ligands, such as rimonabant, retain the ability to activate GPR55. In addition, the role that GPR55 plays in the function and survival of pancreatic β -cells under normal physiological conditions suggests that it may also play a prominent role in the pathophysiology of type 2 diabetes (Simcocks *et al.*, 2014). On the contrary, the role of GPR55 in obesity, an important risk factor for type 2 diabetes, and very often a pathological condition that precedes its onset, seems to be better established (Díaz-Arteaga *et al.*, 2012; Imbernon *et al.*, 2014; Moreno-Navarrete *et al.*, 2012). Taken together, these data seem to support that GPR55 may play an important role in obesity, suggesting that it may also be involved in type 2 diabetes. However, the contribution of this receptor in islets of Langerhans to the hyperinsulinemia, intra-islet inflammation, oxidative stress or apoptosis remains without clarification. All of these processes are related to failure of β -cells typical of diabetes.

B.- JUSTIFICATION OF THE STUDY AND AIMS

The following text summarises a set of fundamental ideas, serving as justification for the formulation of the aims of this doctoral thesis.

Glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) in pancreatic β -cells is modulated by multiple factors, such as nutrients, incretins and other substances, including endocannabinoids. The intracellular signalling network that regulates GSIS is therefore extraordinarily complex and multifactorial. In type 2 diabetes these signalling pathways are altered, which is reflected in the loss of the β -cell mass and alterations in the production of insulin. Cannabinoids exert their regulatory functions on GSIS by acting mainly through the CB1 receptor and other related receptors such as GPR55. The beneficial effects of the pharmacological intervention via these receptors are known, but the information found in the scientific literature regarding their pattern of expression and their ability to modulate GSIS of these receptors is somehow confusing and even contradictory. Little is known about the effects on some signalling pathways such as those of AKT, AMPK or CREB transcription factor, that control cell proliferation, survival from apoptosis and therefore β -cells mass, in both normal and type 2 diabetes conditions. Studies in tissues other than the endocrine pancreas have been performed and demonstrated a role for the CB1 receptor in the mechanisms of cell death and survival involving the Akt/mTOR pathways; to date, it is not clear if both signalling pathways converge on pancreatic islets. In this context, our research group was recently the first to establish, a functional connection between the CB1 receptor and the mTORC1 signalling pathway in pancreatic β -cells. No information is available in the literature about the effects that the CB1 receptor may have on the modulation of reactive oxygen species (ROS), a very important aspect related to the damage that pancreatic islets undergo during type 2 diabetes. A similar situation occurs with GPR55 in relation to cell survival, since this receptor has been associated with proliferative and apoptotic processes in tissues other than pancreatic islets. Finally, although some CB1 antagonists have been described as GPR55 agonists, these effects are still not well established so warrant further investigation.

According to these general ideas, this doctoral thesis proposes the following aims:

1. To analyse the modulation exerted by the cannabinoid receptors CB1 and GPR55 on the intracellular signalling pathways mediated by AKT, AMPK and the CREB transcription factor, involved in the regulation of proliferation, mass growth and energetic status of the pancreatic β -cells in islets of healthy (WT) and pre-diabetic mice, as well as in human islets.
2. To study the modulation of CB1 and GPR55 in the pancreas, the effects on glucose-stimulated insulin secretion (GSIS), and the changes in intracellular Ca^{2+} in islets from C57BL/6J WT and GPR55^{-/-} mice as well as non-diabetic human islets, after treatment with CB1 antagonists or GPR55 agonists *in vitro*.
3. To analyse how the antagonism of CB1 affects the mTOR signalling pathway in islets of healthy (WT) and pre-diabetic mice and what effects it induces on GSIS.
4. To evaluate the modulatory effects that the inhibition or the activation of CB1 exerts on the production of reactive oxygen species (ROS) in rat pancreatic islets and in healthy (WT) and pre-diabetic murine islets.
5. To investigate the role played by GPR55 in the mechanisms of cell survival and susceptibility to apoptosis of pancreatic islets isolated from WT and GPR55^{-/-} mice as well as human islets after treatment with cannabinoid ligands *in vitro*.

C.- MAIN TECHNIQUES/PROCEDURES USED:

To achieve the aims of this doctoral thesis we have made use of the following main techniques or procedures: techniques for the molecular characterization of proteins (Western blot) and hormones (ELISA or RIA); confocal techniques; isolation of pancreatic islets from rats and different murine strains including a C57BL/6J pre-diabetic model developed by our group; intracellular Ca^{+2} measurements in β -cells from pancreatic islets; *in vitro* static experiments of glucose-stimulated insulin secretion; *in vitro* experiments of dynamic insulin secretion (perifusion); quantification of ROS production in pancreatic islets treated with cannabinoid ligands and, measurements of caspases 3/7 activity to determine islets apoptosis capability, among other general laboratory procedures.

All the experiments were carried out in 3 different laboratories: a) Hormones-Research Laboratory, Regional Hospital of Málaga (Spain); b) Laboratories of the Department of Physiology and Biophysics of the Institute of Biomedical Science of the University of Sao Paulo (Brazil) and, c) Laboratory of the Division of Diabetes and Nutritional Sciences, Diabetes Research Group, King's College London, London, (UK).

D.- SUMMARY OF THE MAIN RESULTS AND DISCUSSION

CB1 and GPR55 signalling in pancreatic islets

Generation of an animal model of obesity and pre-diabetes

We have characterised an animal model of obesity and pre-diabetes generated by the prolonged feeding with a commercial available fat-enriched diet, where 45% of the calories consumed originated from fat. For this purpose, we used mice of C57BL/6J strain. Our data confirmed how mice that were fed a high-fat diet for 15 weeks had the features proper of the pre-diabetes, metabolically resembling the human pre-diabetic state and thus constituting a valid model for the molecular study of the signalling pathways and processes altered during the pathogenesis of type 2 diabetes.

In particular, our animal model was used to characterise the involvement of the CB1 receptor expressed by pancreatic islets in the alterations that are possibly produced in some intracellular signalling pathways such as AKT, CREB, AMPK (**aim 1**) and mTORC1 (**aim 3**), as well as and in the production of reactive oxygen species (ROS) (**aim 4**) during the development of diabetes.

Modulation of the Akt, CREB and AMPK intracellular pathways induced by CB1

Regarding to this topic, we carried out both *in vivo* and *in vitro* experiments. For the *in vivo* experiments we use pancreatic islets obtained from both pre-diabetic C57BL/6J and C57BL/6J healthy (WT) mice. Prior to islet isolation, mice were injected with the CB1 antagonist rimonabant and then challenged with a glucose overload. For

the *in vitro* experiments islets isolated from CD-1 mice or non-diabetic human donors, treated with the CB1 antagonist LH-21, were employed, under conditions of high and medium concentration of glucose. To estimate the modulation induced by CB1 of the Akt, CREB and AMPK intracellular signalling pathways, the phosphorylation of the mentioned proteins was evaluated by Western blot.

Data from the *in vivo* experiments showed a decrease in the phosphorylation of AKT and an increased in the phosphorylation of both CREB and AMPK, in islets obtained from non-diabetic healthy animals treated with rimonabant respect to the ones treated with vehicle. We obtained qualitatively similar results in the *in vivo* experiments carried out with islets obtained from pre-diabetic animals although the magnitude of the changes in the phosphorylation of the proteins studied was smaller and statistically non-significant. This fact would suggest that the signalling pathways mediated by Akt, CREB and AMPK are not much affected in response to glucose in pre-diabetic animals.

In the *in vitro* experiments, carried out with islets obtained from CD-1 mice treated with LH-21, changes in the phosphorylation of the Akt, CREB and AMPK proteins were also observed. In particular, in high glucose conditions, a decrease in the phosphorylation of Akt and an increase in the phosphorylation of CREB were registered, similarly to what occurred with islets from non-diabetic mice treated with rimonabant *in vivo*. In contrast, phosphorylation of AMPK decreased, an effect opposite to that observed with rimonabant *in vivo*.

With regard to Akt, whose activation in pancreatic islets stimulates survival and proliferation (Elghazi *et al.*, 2007), genetic and pharmacological experiments previously performed using murine pancreatic islets have shown that both the lack of CB1 as well as its pharmacological blockade increase Akt phosphorylation (Kim *et al.*, 2011). Moreover, in the *db/db* diabetic mice, blockade of CB1 led to an increase in the proliferation of the β -cells (Kim *et al.*, 2011). Therefore, it could be thought that CB1 blockade would have beneficial effects on pancreatic islets in general and in the diabetic condition in particular. These results contrast with those obtained when using murine islets *in vitro* and *in vivo*, but they could be explained if we think that the mice we have generated by prolonged feeding with a high-fat diet are more a model of pre-diabetes rather than diabetes. Other discrepancies between our results and those obtained by other authors could be explained by the different features of the

pharmacological blocker of CB1 used or their possible interaction with other receptors such as GPR55.

With respect to CREB, our results suggest that rimonabant induces cell growth in pancreatic islets of control mice but not in islets from pre-diabetic mice, indicating that an impairment exists in the ability of the CB1 receptor to modulate the CREB transcription factor in the pre-diabetic state. These results could be interpreted based on the ability of CB1 to modulate the intracellular $cAMP$ level. It is noteworthy that certain endocannabinoids increased phosphorylation of CREB, being this effect suppressed after treatment with rimonabant (Casu *et al.*, 2005; Isokawa, 2009). One possible explanation for these discrepancies might be found in the fact that this modulation exerted by rimonabant was dependent on the context of the specie and the tissue. Alternatively, again we cannot rule out that rimonabant and LH-21 might exert their actions through other receptors such as GPR55.

Regarding the metabolic sensor AMPK, *in vivo* treatment with rimonabant increased the phosphorylation of the AMPK in pancreatic islets from mice fed the control diet. In contrast to rimonabant, our *in vitro* experiments on the blockade of the CB1 cannabinoid receptors with LH-21 show that a decrease in the phosphorylation of the AMPK protein occurs in murine islets, rather than an increase. The reason for these differences between the *in vivo* and the *in vitro* experiments are not easy to establish and would require more detailed studies; although it is clear that the environment of a cell in an islet *in vitro* is not the same as it is *in vivo*, due to the lack of blood supply and the normal neuro-endocrine control.

With respect to experiments on human islets, blockade of CB1 in islets treated with LH-21 *in vitro*, markedly increased the phosphorylation of AKT rather than decreasing it, as it occurred in murine islets with both LH-21 and rimonabant *in vivo*. However, not changes in CREB or AMPK phosphorylation were observed. The different effects observed when using human pancreatic islets instead of murine islets indicate that there are clear inter-species differences in the action of CB1 in the modulation of the signalling pathways studied.

In summary, as discussed in this section, CB1 modulates the AKT, CREB and AMPK signalling pathways in pancreatic islets, suggesting that some of the beneficial effects reported for CB1 blockade in islets could be mediated by these pathways, especially related to the role of AKT and CREB in increasing the β -cell mass. In addition, the response to pharmacological manipulation of CB1 is different in islets from pre-diabetic mice than controls, suggesting that these receptors may play some role in the

pathophysiology of type 2 diabetes.

On the other hand, and given the repeated inter-species differences found, it is necessary to point out the desirability of studies in human islets, both from diabetic and non-diabetic donors, to validate the results obtained in rodent islets, as well as to use several CB1 agonists and antagonists with the scope to unambiguously determine the true role of CB1 in the modulation of these intracellular pathways in order to clarify their possible participation in the pathogenesis and pathophysiology of type 2 diabetes in human.

Finally, we cannot rule out that some of the effects observed with rimonabant or LH-21 might be mediated through other receptors, such as GPR55, since the actions of these molecules have been described through this receptor (Ruz-Maldonado *et al.* 2015; Henstridge *et al.*, 2010).

AKT, CREB and AMPK intracellular pathways modulation by GPR55

In addition to CB1, we have studied the ability of GPR55 to modulate the AKT, CREB and AMPK signalling pathways in pancreatic islets isolated from healthy mice and human donors. These experiments were carried out *in vitro* and the islets were treated with Abn-CBD, a selective agonist of GPR55. Thus we found that Abn-CBD is able to modulate all the three pathways mentioned above in murine islets but only the AKT pathway in human islets. These results suggest that the endogenous ligand of GPR55, LPI, could signal through these pathways to exert its biological effects. In particular, Abn-CBD decreased Akt phosphorylation and increased CREB phosphorylation and AMPK in murine islets whereas in human islets it increased the AKT phosphorylation without altering the phosphorylation status of both CREB and AMPK. Thus, GPR55 in murine and human islets could play a role in AKT-mediated processes, such as cell proliferation and regulation of the β -cell mass.

For what concerns CREB, LPI, AM251 and rimonabant have all been shown to increase its levels of phosphorylation in HEK293 cells (Henstridge *et al.*, 2010), but there are no publications linking GPR55 to the signalling via AMPK. In addition, none of these studies have been performed in pancreatic islets, nor have they been linked to the pathophysiology of type 2 diabetes. To our knowledge, the results presented in this thesis constitute the first evidence of the modulation of these signalling pathways through GPR55. Although we cannot exclude that part or all of the effects exerted by Abn-CBD on the modulation of these islet pathways may be mediated by other

receptors. In this sense, it should be remembered that Abn-CBD has also been associated with GPR18 (McHugh *et al.*, 2010; Console-Bram *et al.*, 2014) that has been identified in the pancreas (Rajaraman *et al.*, 2016).

Likewise, as was the case for CB1, differences between the results obtained with murine and human islets were again observed, suggesting inter-species differences in the signalling pathways that are recruited after GPR55 activation. This fact underscores the need to use also human islets to validate GPR55 as a possible therapeutic target for type 2 diabetes.

Role of CB1 and GPR55 on the insulin secretory response induced by glucose

In this thesis, the effects of rimonabant, LH-21 and Abn-CBD on glucose-stimulated insulin secretion were evaluated in murine pancreatic islets (strains used: ICR, C57BL/6J WT and C57BL/6J GPR55^{-/-}) and human islets from non diabetic donors. Measurements of change in intracellular Ca²⁺ concentration, together with experiments of static and dynamic insulin secretion (perfusion) were carried out.

Despite the confirmation of the expression of CB1 by both rodent and human β -cells (Bermúdez-Silva *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011; González-Mariscal *et al.*, 2016), it is not yet clear what are the effects on insulin secretion induced by a blockade or a stimulation of CB1.

The results obtained in this doctoral thesis show that rimonabant decreases insulin secretion under static conditions when islets from non pre-diabetic C57BL/6J mice are used, and that LH-21 shows the same effect in murine (ICR) and human islets, but not in islets from C57BL/6J mice where LH-21 does not appear to have an effect.

It is well known that the mobilisation of intracellular Ca²⁺ is coupled to insulin secretion. Therefore, we also wanted to investigate the behaviour of Ca²⁺ fluxes in the presence of high glucose and CB1 antagonists, using LH-21 as candidate lead. Our results show that LH-21 increased [Ca²⁺]_i, both in pancreatic islets of C57BL/6J and human donors. These results would naturally lead to an increase in the insulin secretion in the presence of LH-21, something that was not observed in the static secretion experiments and that, in turn, was clearly evident under dynamic conditions (perfusion). The reason for the opposite behaviours in the insulin secretions between conducting static and dynamic experiments, most likely lie in the different experimental design behind the two techniques. In our opinion, the particular nature

of the dynamic assay makes the result more accurate and precise and, above all, unaffected by interferences eventually induced by the accumulation of other hormones or metabolites in the static assays (Li *et al.*, 2011).

Thus, it could be concluded that both LH-21 and rimonabant have a direct effect on pancreatic islets, modulating insulin secretion. Taking into account that the experiments of dynamic insulin secretion constitute an experimental design closer to the situation *in vivo*, one might think that the physiological action of these molecules would be to favour the increase of insulin secretion, which theoretically would help to improve the regulation of plasma glucose. However, we cannot forget the technical limitations of the model, such as the use of isolated islets, deprived of innervation and input by factors released from other tissues.

We have also investigated the possible implication of GPR55 in the modulated effects caused by LH-21, for which we used islets isolated from C57BL/6J WT and transgenic GPR55^{-/-}, mice which were treated with different concentrations of LH-21. We found that in islets obtained from GPR55^{-/-} mice, [Ca²⁺]_i is not further increased as well as glucose-induced insulin secretion when glucose is used in combination with LH-21 at 1nM and 100nM. Therefore, it can be stated that at least part of the potentiation of insulin secretion induced by LH-21 in pancreatic islets are mediated by GPR55, rather than CB1 as initially thought (Ruz-Maldonado *et al.*, 2015).

Moreover, we studied the role of GPR55 in the glucose-stimulated insulin secretion. For this, we have used the most well-known GPR55 agonist to date, the Abn-CBD. We carried out experiments of static and dynamic secretion. Probably the most interesting results were obtained with the dynamic approach. In experiments of dynamic insulin secretion, release of insulin was significantly increased upon treatment with Abn-CBD in both, mouse and human islets, with no effect at 10μM in islets isolated from C57BL/6J GPR55^{-/-} mice. The effect on human islets was clearly dose-dependent. Therefore, it is possible to conclude that Abn-CBD increases the secretion of insulin in mouse and human islets; an effect being mediated by GPR55 at least in mice.

In relation to the results of the dynamic secretion it is striking that at 10μM the effect seems to be dependent on the presence of GPR55, while at the lowest concentration (1μM), the potentiation of insulin secretion is observed in both islets from C57BL/6J WT and GPR55^{-/-}, which would lead to the conclusion that Abn-CBD has also effects independent than GPR55. A possible explanation for this fact is that Abn-CBD may be acting at low concentrations through another receptor, such as GPR18, which has also been implicated in Abn-CBD actions (Console-Bram *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2013).

Therefore, our results confirm a role for Abn-CBD in glucose-stimulated insulin secretion through GPR55, as well as possible extra-GPR55 effects that are also stimulatory of insulin secretion. These Abn-CBD effects are also present in human islets, suggesting that this molecule could constitute a new pharmacological tool to treat type 2 diabetes.

Interaction between the cannabinoid receptor CB1 and the mTORC1 signalling pathway

Together with the study of the modulation of the signalling pathways of Akt, CREB and AMPK by CB1, the mTORC1 pathway has also been object of studies in the present thesis, with some of these results been already published (Bermúdez-Silva *et al.*, 2016)

In vitro treatment of pancreatic islets with rimonabant increased the phosphorylation of the kinase p70S6K, target of the mTORC1 protein complex, an effect that was reversed by pre-incubation with rapamycin (selective inhibitor of mTORC1). Therefore, our results suggest that CB1 blockade increases the activation of the pathway, participating in the physiological actions mediated by CB1. This may be the mechanism by which CB1 blockade induces proliferation and increase of β -cell mass (Kim *et al.*, 2011; Bermúdez-Silva *et al.*, 2016). In addition, we have found that mTORC1 is involved in the modulation of insulin secretion exerted by CB1, since the decrease induced by rimonabant in isolated pancreatic islets in static secretion experiments is dependent on the existence of a functional mTORC1 pathway. Blockade of this pathway with rapamycin eliminated the effect of rimonabant on insulin secretion.

We have also studied the activation of mTORC1, by the quantification of the phosphorylation of p70S6K, in pancreatic islets from healthy and pre-diabetic mice injected with rimonabant acutely. The islets from pre-diabetic animals showed higher p70S6K phosphorylation than control mice, compatible with an activation of the mTORC1 pathway promoting an increase in the β -cell mass. However, in islets from both healthy and pre-diabetic animal, rimonabant decreased p70S6K phosphorylation, suggesting a lower activation of the mTORC1 pathway. This is opposed to what observed in pancreatic islets treated with rimonabant *in vitro*. These differences could arise from interferences caused by the effects that the compound may exert in other target tissues when administered *in vivo*, as compared to when it is added to the

medium *in vitro* where its effects are specifically directed onto islets.

We also studied the involvement of mTORC1 in the modulation exerted by CB1 on insulin secretion in islets from pre-diabetic mice. Our results show that rimonabant had a tendency to decrease insulin secretion, similar to the effect observed in islets from healthy mice, although the statistical significance was not reached. In addition, pre-incubation with rapamycin did not block the effect of rimonabant, suggesting a disconnection between the signalling pathways initiated by CB1 and the mTORC1 pathway in the pre-diabetes model.

As a summary, we can conclude that the *in vitro* blockade of the cannabinoid receptor CB1 with rimonabant decreased GSIS and increased the activity of the mTORC1 target, p70S6K, in pancreatic islets from WT mice, thus suggesting the involvement of mTORC1 in the physiological actions of CB1 and, in turn, the participation of CB1 in the phenomena of increased proliferation and β -cells mass promoted by mTORC1.

Therefore, both pathways appear to be functionally connected in the pancreatic islets (Bermúdez-Silva *et al.*, 2016). In addition, the activity of this protein complex is also increased in the islets of pre-diabetic mice, which may negatively affect the insulin signalling through a negative feedback on IRS, although the effects of CB1 on insulin secretion are no longer dependent on mTORC1, suggesting that this alteration in the CB1-mTORC1 binding may play a role in the pathophysiology of type 2 diabetes.

The production of reactive oxygen species (ROS) in pancreatic islets and the cannabinoid receptor CB1

In order to estimate the production of reactive oxygen species (ROS), the levels of the superoxide anion in islets were quantified by confocal microscopy using the dihydroethidium method. ROS levels have been investigated following the treatment *in vitro* with cannabinoid ligands in islets from rat and mouse. The rats employed in this study were Wistar whilst the mice belonged to the C57BL/6J strain. Production of ROS in isolated pancreatic islets from pre-diabetic and control mice was also evaluated.

Our results show that, under conditions of acute stimulation with high glucose concentration, ROS content was lower than in low glucose conditions in both rat and murine pancreatic islets. On the other hand, islets from pre-diabetic animals showed a lower ROS content than islets from control animals. Other authors have found a

similar result in pancreatic islets from obese rats also fed a high-fat diet (Valle *et al.*, 2011). In contrast, studies with models of glucotoxicity and islet from diabetic rats have shown an increase in ROS and oxidative damage (Tanaka *et al.*, 2002; Bindokas *et al.*, 2003). The lowest amount of ROS detected in our experiments at high glucose may be due to an efficient activity of the mechanisms designated to counteract the ROS excess in response to high glucose, both in islets from healthy animals and in pre-diabetic mice acutely stimulated with glucose, while in islets subjected to continuous stimulation of glucose or islets heavily damaged by the diabetic condition may be unable to counteract this damage, with an increase in ROS.

Interestingly, there is no effect of CB1 activation on ROS production under high glucose conditions (16.7mM). This can be related to the fact that CB1 is mostly expressed in α -cells at least in rodents, (Juan-Picó *et al.*, 2006; Starowicz *et al.*, 2008; Bermúdez-Silva *et al.*, 2009), which is a cell population mainly active under low glucose conditions, whereas the lower expression of CB1 in β -cells could lead to a less importance of CB1 for the production of ROS in high glucose conditions.

Specifically, our results suggest that cannabinoid receptor-mediated signalling may favour the reduction of the oxidative damage induced by ROS under conditions of α -cell hyperactivation. Interestingly, in type 2 diabetes there is also an imbalance in glucagon secretion that contributes to hyperglycemia (Spellman, 2007; Burcelin *et al.*, 2008), and the role of CB1 receptors may be important in the reduction of the oxidative stress related to this imbalanced.

Since the pharmacological effects of ACEA and rimonabant from rat islets were observed only in low glucose conditions, experiments on islets from C57BL/6J mice, from both healthy and pre-diabetic animals, were performed only in this condition of low concentration of glucose. Thus, the blockade of the CB1 receptors of pancreatic islets with rimonabant increased ROS content in isolated pancreatic islets from healthy mice, but not from rats. Thus, in mouse islets, rimonabant might behave as a CB1 inverse agonist, producing a pharmacological response opposite that of the agonist ACEA. In rat islets, on the other hand, rimonabant does not show any effect *per se*. This difference between rat and mouse islets could be due by the inter-species heterogeneity in the action shown by some cannabinoid ligands, which could be related to differences in expression of CB1 and/or other receptors with sensitivity to these compounds, such as GPR55.

For what concerns the islets from pre-diabetic mice, the effect of CB1 blockade with rimonabant was also investigated, given the numerous evidences on the improvement

that this compound provides to the diabetic profile. Our experiments show that rimonabant does not induce an increase in ROS in islets from pre-diabetic mice, as it does in islets from healthy mice. Therefore, a different response to rimonabant is observed between healthy and pre-diabetic islets.

Overall, our data suggest that CB1 is involved in the modulation of ROS levels in pancreatic islets under low glucose conditions, so that when it is stimulated by its ligand, the ROS content diminishes, suggesting that this could be a relevant mechanism to decrease the oxidative stress in the α -cell. In addition, the effect of rimonabant on ROS in islets from pre-diabetic animals is different from what registered in healthy animal, suggesting that alterations in the CB1 expression occurring in obesity and pre-diabetes may be involved in the changes in the redox homeostasis that occurs during the development of the disease.

GPR55 and β -cell survival

There is a considerable evidence that the cannabinoid receptors play an important role in proliferation and apoptosis, suggesting that the modulation of these receptors may be a promising therapeutic approach to combat various types of cancer (Nikan *et al.*, 2016). In addition, CB1 has been implicated, among other tissues, in the phenomena of proliferation and apoptosis that occur in pancreatic islets during the development of type 2 diabetes (Kim *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2012).

In addition, the role of GPR55 has been extensively studied in the context of cancer, given the multitude of evidence that its activation promotes proliferation as well as participation in tumor invasiveness phenomena (reviewed in Henstridge *et al.*, 2011). However, the participation of GPR55 in proliferation and apoptosis occurring in the endocrine pancreas during the development of type 2 diabetes has not been studied. Evidence from Dr. Persaud's group (Liu *et al.*, 2014) points in this sense, since mice lacking GPR55 showed an increase in islet cell apoptosis as well as insufficient proliferation in a situation of high demand of insulin (Liu *et al.*, 2014).

In this doctoral thesis the anti-apoptotic capacity of LH-21 and Abn-CBD in isolated pancreatic islets from both mice and humans has been studied after stimulation of programmed-cell death with a pro-apoptotic cocktail of cytokines. In addition, these experiments have also been performed on islets from C57BL/6J GPR55^{-/-} mice with the idea to investigate whether these effects are mediated by GPR55. Both LH-21 and Abn-CBD significantly increased survival in islets from GPR55 WT mice and in human

islets, reducing apoptosis in the presence of pro-apoptotic cytokines. The effect of both cannabinoid ligands was abolished in the islets from GPR55 KO mice suggesting that they act through a GPR55-dependent mechanism (Ruz-Maldonado *et al.*, 2015).

These results are consistent with those obtained by Dr. Persaud's group, suggesting that GPR55 activation may play an important role in counteracting diabetes-induced apoptosis in pancreatic islets. Interestingly, this protective effect is maintained in human islets. Thus, compounds such as LH-21 and Abn-CBD, as well as others targeting GPR55, may be useful for the management of cell damage occurring in the pancreatic islet during type 2 diabetes.

E.- CONCLUSIONS

After the analysis of the results contained in this doctoral thesis the following conclusions have been obtained:

1. A mouse model of obesity and pre-diabetes has been developed, whose alterations in glucose homeostasis are similar to those occurring in human pre-diabetic subjects. The murine model is also valid for the study of the alterations proper of the pathogenesis of type 2 diabetes.
2. The cannabinoid receptor CB1 modulates the activity of AKT, CREB and AMPK in pancreatic islets from healthy mice and human, suggesting that the processes regulated by these pathways, such as the proliferation and increase of islet mass, are modulated by CB1.
3. CB1-dependent modulation of the signalling promoted by AKT, CREB and AMPK is decreased or absent in islets from pre-diabetic mice, suggesting that CB1 might play a role in the development of type 2 diabetes.
4. Similarly to CB1, GPR55 modulates the AKT, CREB and AMPK pathways in islets from non diabetic mice. Only the AKT pathway seems to be affected by GPR55 stimulation in humans, indicating that inter-species differences exist for this receptor. At the same time, these results suggest that LPI, the endogenous ligand of GPR55, could activate the AKT signalling pathway for producing its biological effects in islets of Langerhans.

5. CB1 and GPR55 modulate the mobilisation of intracellular Ca^{2+} and regulate glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) in pancreatic murine and human islets. However, the results obtained under dynamic conditions (perifusion) are different from those acquired under static secretion. As the dynamic secretion constitutes an experimental tool more physiological and similar to what occurs *in vivo* than the static incubation, these results reflect more accurately the role played by CB1 and GPR55 in the modulation of the GSIS.
6. The cannabinoid ligand LH-21, at low concentrations, increases the mobilisation of intracellular Ca^{2+} and potentiates GSIS in murine and human islets with positive effects on insulin secretion. Such effects were not observed in islets from mice knockout for GPR55, so they are possibly mediated by GPR55, and not by CB1 as initially thought.
7. The GPR55 agonist, Abn-CBD, increases the mobilisation of intracellular Ca^{2+} and potentiates GSIS in pancreatic islets through GPR55-dependent and independent mechanisms, showing that it promotes insulin secretion, despite being considered in the literature a highly selective agonist of GPR55.
8. The cannabinoid receptor CB1 and the mTORC1 intracellular signalling pathway (via p70S6K) are functionally connected, modulating GSIS in the pancreatic islets. In addition, this interaction is altered in islets from pre-diabetic mice, suggesting that it contributes to the pathophysiology of type 2 diabetes.
9. CB1 participates to the modulation of the ROS content in islets of Langerhans, under conditions of low glucose concentration. In addition, this modulation is altered in islets from pre-diabetic mice, suggesting that it plays a role in the pathophysiology of type 2 diabetes.
10. The cannabinoid ligands LH-21 and Abn-CBD protect from apoptosis in both murine and human pancreatic islets, in a GPR55 dependent manner. Thus, these compounds (and other GPR55 agonists) may be useful in preserving from programmed cell death occurring in islets death occurring in islets during type 2 diabetes.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

I. INTRODUCCIÓN



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1.1 EL ISLOTE DE LANGERHANS DE HUMANOS Y ROEDORES

Los islotes de Langerhans son estructuras muy innervadas e irrigadas por capilares sanguíneos formados por células que tienen como función principal la regulación de la homeostasis sanguínea de la glucosa. En humanos, los islotes pancreáticos se encuentran distribuidos por todo el páncreas, siendo más abundantes en la región caudal. Su número oscila entre 600.000 y 2.000.000, dependiendo del tamaño del órgano.

El páncreas es un órgano situado en el abdomen estrechamente asociado al intestino delgado a través del conducto pancreático. Dicho conducto se une al conducto biliar del hígado a través del cual ambos órganos liberan sus secreciones al duodeno (**Fig. 3**).

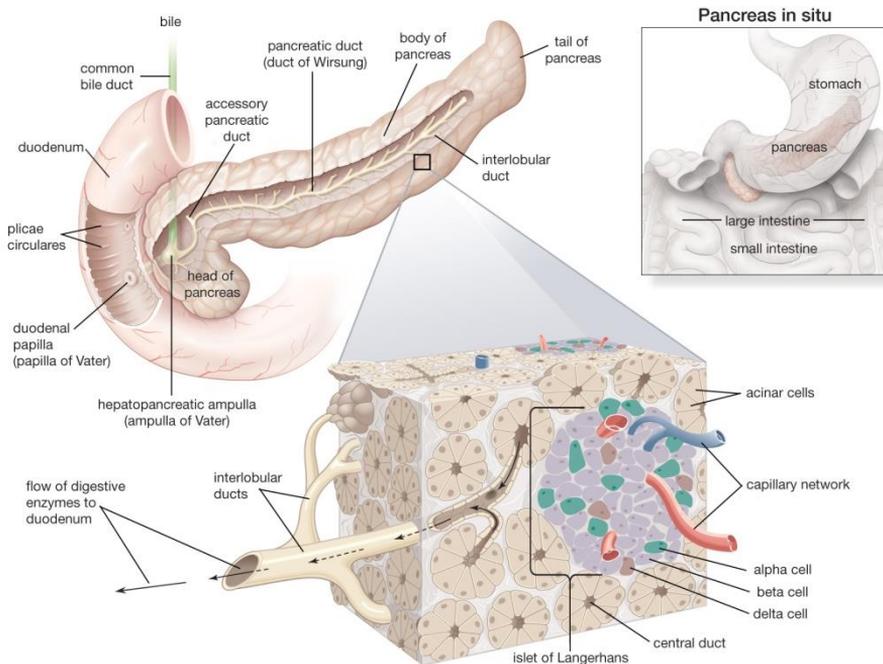


Figura 3. Diagrama que ilustra la posición del páncreas en relación con los principales órganos viscerales (estómago y tracto intestinal), y una sección a través del páncreas indicando los numerosos conductos exocrinos rodeados por las células acinares, y las células principales que comprenden un islote de Langerhans (Enciclopedia Britannica, 2003).

Los islotes pancreáticos son asociaciones altamente especializadas de células que derivan del endodermo en el desarrollo embrionario, y comienzan a ser distinguibles y funcionales a partir de la semana 16 en humanos. Están formados por 5 tipos

celulares: células beta (β) que secretan insulina, células alfa (α) que secretan glucagón, células delta (δ) que secretan somatostatina, células PP que secretan polipéptido pancreático y un pequeño grupo de células epsilon (ϵ) que secretan grelina.

La organización celular de los islotes pancreáticos difiere de una especie a otra, así como el porcentaje de cada uno de los tipos celulares que contienen. Por ejemplo, en islotes de rata o de ratón la población celular mayoritaria son las células β , las cuales suponen un 65-80% del total celular. Dichas células se encuentran predominantemente localizadas en el interior del islote. Las células no β ; esto es, las células α (15-20%), las δ (10%) y las PP (menos del 1%) aparecen distribuidas alrededor de la periferia (Steiner *et al.*, 2010; Pfeifer *et al.*, 2015). Algunos autores sostienen que los islotes humanos y de especies como el cerdo, difieren de los de roedores tanto en lo que respecta a la proporción como a la localización de estos tipos celulares, considerando que presentan una distribución espacial aleatoria en el islote, sin guardar por tanto aparentemente ningún patrón definido (Brissova *et al.*, 2005; Cabrera *et al.*, 2006). Otros autores, en cambio, han propuesto la existencia de un cierto orden estructural en los islotes humanos y definen poblaciones de células β que conforman un núcleo central (Orci, 1976), lóbulos (Erlandsen *et al.*, 1976), patrones en forma de trébol (Bonner-Weir *et al.*, 2008), estructuras con forma de cinta (Grube *et al.*, 1983) o placas trilaminares plegadas (Bosco *et al.*, 2010; Dolensek *et al.*, 2015).

Las células β de humanos constituyen del 48-59% del total de células del islote, las α del 33-46%, las δ del 8-12% y las PP menos del 2%. En rata o ratón, en cambio, hay un mayor porcentaje de células secretoras de insulina y una menor proporción de células secretoras de glucagón que en humanos (Cabrera *et al.*, 2006; Steiner *et al.*, 2010). En la **Fig. 4** se muestra las diferentes distribuciones espaciales de células de islotes procedentes de diferentes especies como ratón (A), cerdo (B) y humano (Hoang *et al.*, 2014).

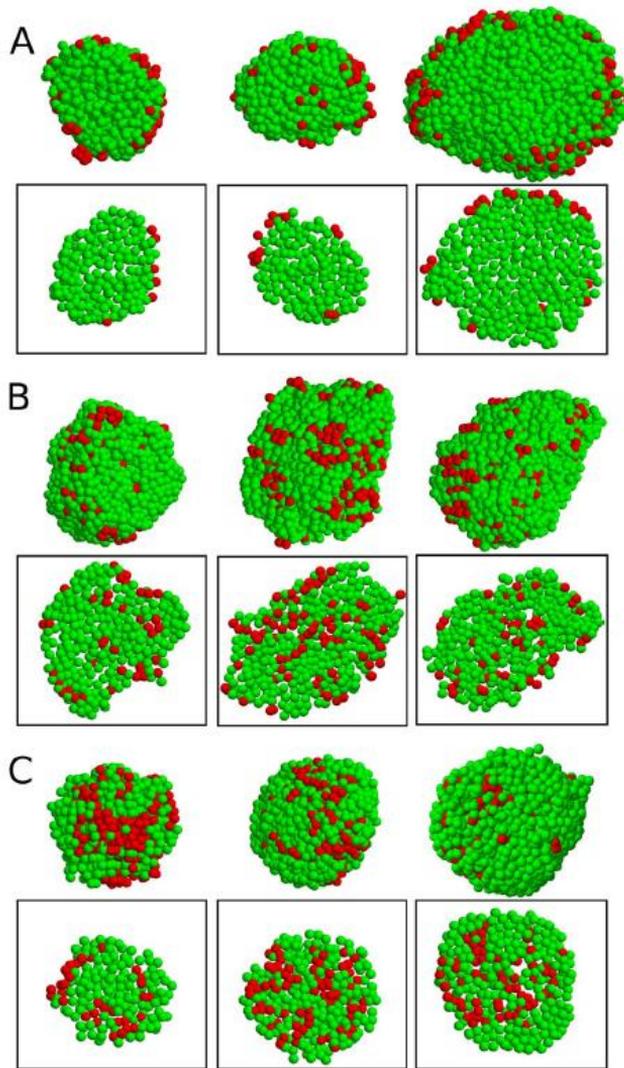


Figura 4. Distribución celular en 3D y 2D (imágenes en recuadros) de islotes pancreáticos de ratón (A), cerdo (B) y humano (C). Las células β aparecen en color verde y las células α en rojo (Hoang *et al.*, 2014).

Dependiendo del tamaño del islote: pequeño (menos de 1.000 células), mediano (de entre 1.000 y 2.000 células) y grande (más de 2.000 células), la fracción de células β también varía en islotes humanos sobre todo si se la compara con la de islotes de ratón y de cerdo. En islotes humanos, también, cuanto mayor es el tamaño del islote, menor es su porcentaje en células β . Sin embargo, en los islotes de ratones la fracción de células β parece ser independiente del tamaño del islote (Hoang *et al.*, 2014). La

función de los islotes está influenciada por su tamaño. Así, el tamaño de los islotes afecta a la capacidad de respuesta a la glucosa. Normalmente, los islotes de mayor tamaño liberan más insulina a concentraciones de glucosa más bajas que los más pequeños (Tasaka *et al.*, 1989; Elayat *et al.*, 1995; Aizawa *et al.*, 2001).

A pesar de las diferencias entre especies tanto en la composición como en la distribución celular de los islotes pancreáticos, los mecanismos físicos que suceden en la morfogénesis de los mismos parecen estar conservados evolutivamente (Hoang *et al.*, 2014). La hipótesis de la adhesión diferencial formulada por Steinberg explica que las diferencias en la adhesión entre los tipos celulares determinan el desarrollo y el mantenimiento de la estructura de los órganos (Steinberg, 1963 y 2007). Otros estudios proponen que las células no β son componentes determinantes de la arquitectura y comunicación intercelular del islote (Brereton *et al.*, 2015). Teniendo en cuenta la simetría específica que presentan las interacciones entre las células α , β y δ , su organización espacial debe tener también una gran importancia funcional. De hecho, las adhesiones en las células β a través de las uniones tipo gap parecen potenciar la secreción de insulina (Charollais *et al.*, 2000). Las conexiones entre células homotípicas (por ejemplo, una célula β con otra célula β vecina) son significativamente más fuertes que las atracciones entre células heterotípicas, aunque también esto varía según la especie. La diferencia de interacciones entre célula α y β y células β y β es mínima en los islotes humanos si se compara con los islotes de roedores o de cerdo, maximizando la plasticidad de las estructuras del islote (Hoang *et al.*, 2014). Esta plasticidad morfogenética de los islotes (Jamal *et al.*, 2005) tiene una gran implicación funcional cuando las condiciones fisiológicas se alteran (Steiner *et al.*, 2010). Es de reseñar que la morfología de los islotes de ratones diabéticos (*db/db*) y de ratones preñados es similar a la distribución celular propia de los islotes humanos, no presentando la distribución característica de islotes típica de roedores (Steiner *et al.*, 2010).

Las células endocrinas de los islotes de Langerhans se encuentran bien inervadas por fibras nerviosas del sistema simpático, parasimpático y sensorial (Ahrén, 2000), creyéndose que la secreción hormonal del islote a nivel nervioso está regulada, principalmente, por la rama parasimpática (Rossi *et al.*, 2005; Arrojo e Drigo *et al.*, 2015; Dolensek *et al.*, 2015). La anatomía y fisiología de la microvascularización del islote muestran que la primera población perfundida son las de células secretoras de insulina, seguidas de las células no β (Samols *et al.*, 1988) y finalmente las células exocrinas peri-insulares (Papaccio, 1993). Además, los islotes pancreáticos se encuentran sometidos a un control tanto autocrino como paracrino consecuencia de

la secreción hormonal de las distintas células que los componen y de otras moléculas de señalización relevantes en la funcionalidad del islote como la acetilcolina, el glutamato, el ATP y el ácido γ -aminobutírico (GABA) (**Fig. 5**).

En respuesta a un incremento en los niveles de glucosa, las células β secretan insulina, la cual, aparte de ejercer sus efectos en tejidos extrapancreáticos diana, se une a los receptores A y B (IR-A e IR-B) de las células β y α , regulando la expresión de los genes de la insulina y del glucagón además de la exocitosis de ambas hormonas. El ATP es secretado junto con la insulina y actúa sobre los receptores purinérgicos P2X/Y presentes en las células β . Éstas, también secretan GABA, que actúa sobre las células β de una manera autocrina a través de los receptores GABA_A y GABA_B. Cuando los niveles de glucosa en sangre son bajos, las células α secretan glucagón, glutamato y acetilcolina. Esta última proviene de dos fuentes distintas si se trata de islotes de roedores o islotes humanos; en los islotes pancreáticos de roedores, la acetilcolina es secretada por las fibras parasimpáticas que rodean las células β , mientras que en los islotes humanos, la acetilcolina es secretada por las células α (Arrojo e Drigo *et al.*, 2015). El glucagón se une a los receptores de glucagón en las células β y α , regulando la secreción de la insulina y la expresión del gen del glucagón. De igual forma, el glutamato se une a los receptores AMPA y NMDA en las células β y α , regulando la exocitosis de la insulina y del glucagón. La acetilcolina, además se une a los receptores muscarínicos en las células β y δ , regulando la secreción de insulina y somatostatina. Niveles altos y bajos de glucosa en sangre desencadenan la secreción de somatostatina a través de las células δ , cuya hormona se une a los receptores de somatostatina (SSTRs) en las células β y α , inhibiendo la secreción de insulina y de glucagón.

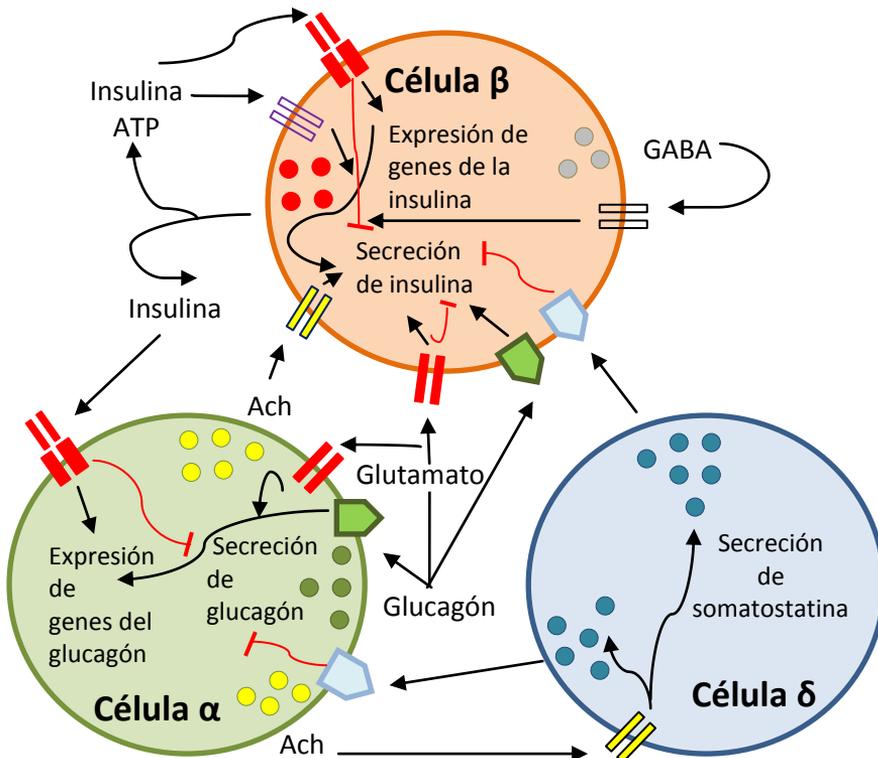
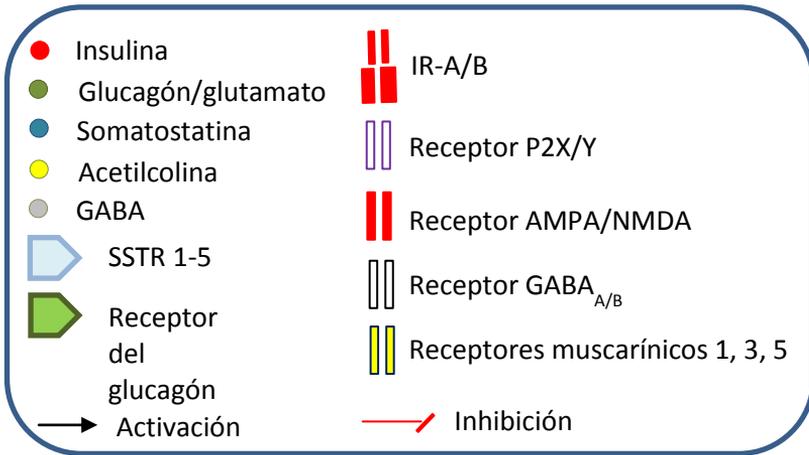


Figura 5. Esquema que representa la señalización paracrina y autocrina entre los tipos celulares más representativos en un islote de Langerhans (Adaptado de Arrojo e Drigo *et al.*, 2015).

1.2 SECRECIÓN DE INSULINA ESTIMULADA POR GLUCOSA (GSIS) Y CONTROL DE LA SECRECIÓN HORMONAL

La insulina es una hormona polipeptídica secretada por las células β de los islotes pancreáticos. Se sintetiza en el retículo endoplasmático rugoso en forma de precursor polipeptídico de cadena sencilla conocido como preproinsulina (Mayer *et al.*, 2007). La preproinsulina se encuentra encerrada en el interior de microvesículas en las cisternas del retículo endoplásmico, donde sufre algunas modificaciones estructurales como cambios en el plegamiento de la cadena y formación de puentes disulfuro transformándose en proinsulina. Así, es transportada al aparato de Golgi, donde se empaqueta en gránulos de secreción. En el interior de estos gránulos se produce la maduración proteolítica de la proinsulina (veáse más adelante) que ocasiona la liberación del denominado péptido C y la forma final de la molécula de insulina constituida por dos cadenas enlazadas por puentes disulfuro. La presencia de concentraciones suficientes de glucosa en los capilares que riegan los islotes pancreáticos desencadena el mecanismo de liberación de insulina produciéndose la fusión de la membrana de los gránulos con la membrana plasmática celular y liberándose por exocitosis el contenido de los mismos a la sangre. Este proceso de acoplamiento entre el estímulo (glucosa) y la secreción (insulina) se denomina secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS; del inglés, glucose-stimulated insulin secretion).

La GSIS es un proceso bifásico, caracterizado por una primera fase precoz y rápida de secreción de insulina de unos 6min de duración y una segunda fase gradual de secreción de insulina más tardía, menos intensa y sostenida, que persiste aproximadamente durante 60min (**Fig. 6**) (Rorsman *et al.*, 2000; Shigeto *et al.*, 2006; Komatsu *et al.*, 2013). Se ha demostrado que esta respuesta bifásica, descrita por primera vez por Grodsky en 1970, es fundamental para conseguir una adecuada homeostasis de la glucosa. Notablemente, en los sujetos con diabetes la primera fase de secreción de insulina está ausente.

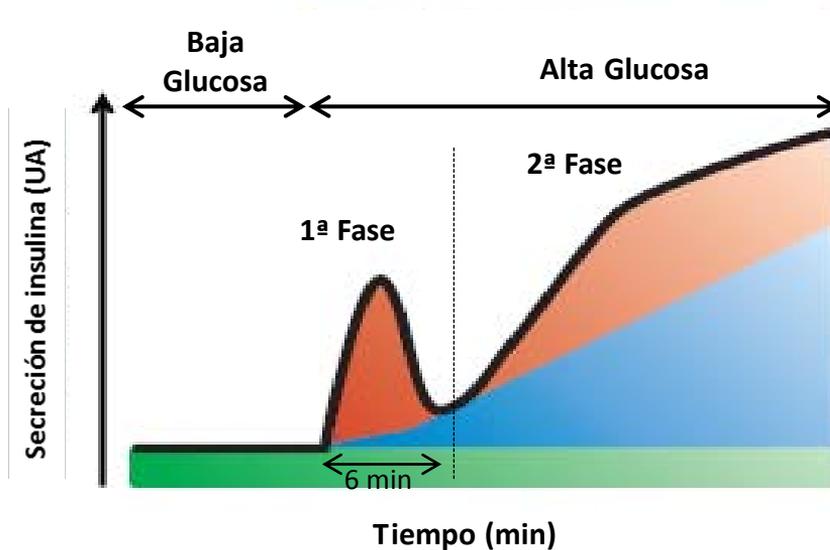


Figura 6. Diagrama que representa la secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS). La línea continua representa la cinética bifásica de liberación de insulina. La línea discontinua separa la primera fase de la segunda. Bajas y altas concentraciones de glucosa se refieren a niveles no estimulatorios y niveles estimulatorios de la secreción de insulina, respectivamente. La secreción de insulina se produce de manera pulsátil y cíclica. En color verde se representa la secreción basal de insulina. En rojo, la liberación de insulina resultado de los mecanismos de liberación de insulina dependientes de canales K_{ATP} . En azul, se observa la secreción de insulina potenciada por los mecanismos independientes de los canales de K_{ATP} . Adaptado de Komatsu *et al.*, 2013.

La cantidad de glucosa necesaria para la liberación de insulina por parte de las células β es similar en islotes humanos y de ratones, pero no en islotes de rata, donde se necesita comparativamente el doble de glucosa. Así, la GSIS en islotes humanos y de ratones tiene lugar cuando la concentración de glucosa sanguínea es igual o superior a 4mM, y los mayores picos de insulina ocurren a concentraciones de glucosa iguales o superiores a 16mM (aproximadamente el 50% de los picos máximos de GSIS suceden a 8mM) (Pick *et al.*, 1998; Henquin *et al.*, 2006). En rata, la GSIS tiene lugar a partir de 8mM de glucosa y el 50% de los picos máximos y los valores máximos de la GSIS se alcanzan a 12 y 20mM, respectivamente (Vieira *et al.*, 2007).

La cinética de la secreción de insulina es especie dependiente; los islotes de ratones presentan una aguda y pronunciada primera fase y una segunda fase más acusada que la de los islotes humanos. En los islotes de rata sucede lo contrario en relación a la primera fase, ya que ésta es menos pronunciada que la segunda.

La primera fase de liberación de insulina se produce por un mecanismo dependiente de los canales de K^+ dependientes de ATP (K_{ATP}) y presumiblemente se debe a la exocitosis de los gránulos de insulina preformados y ordenados cerca de la membrana plasmática. La segunda fase de liberación de insulina se produce por mecanismos independientes de los canales de K_{ATP} y parece estar relacionada con su biosíntesis *de novo* así como con la generación de metabolitos y segundos mensajeros (ATP, AMP_c, NADPH e intermediarios del ciclo de Krebs), señales neurohormonales (acetilcolina o GLP-1 que activan a la proteína quinasa C o a la proteína quinasa A), ácidos grasos libres (FFA) y aminoácidos que aumentan los niveles de Ca^{2+} intracelular y, por tanto, amplifican la secreción de la insulina (**Fig. 7**).

1.2.1 Primera fase de la GSIS: mecanismo de liberación de insulina dependiente de canales K_{ATP}

La glucosa que llega a los islotes a través de los capilares sanguíneos que los irrigan alcanza el citosol de las células β a través del transportador específico de glucosa GLUT-2 (en roedores) o, también, GLUT-1 o GLUT-3 (en humanos). Rápidamente, la glucosa es fosforilada por la enzima glucoquinasa formando glucosa-6-fosfato (G6P), la cual, como consecuencia de las cargas negativas de su fosfato queda atrapada en el interior celular. El metabolismo oxidativo de la G6P produce un aumento intracelular del cociente ATP/ADP que cierra los canales de K_{ATP} . Estos canales son los responsables de mantener el potencial de reposo de la célula β (Dunne *et Petersen*, 1986). El número de canales K_{ATP} cerrados cuando la concentración de glucosa es superior a 5-7mM es suficiente para alcanzar el umbral de despolarización de la membrana plasmática necesario para generar actividad eléctrica. Dean y Matthews, en un trabajo publicado en la revista *Nature* en 1968, fueron los primeros en proponer este modelo basado en la naturaleza electrofísica de las células β (Ascroft *et al.*, 1984; Cook *et al.*, 1988). Esta actividad eléctrica sigue un patrón oscilatorio con superposición de potenciales de acción sobre las mesetas de las oscilaciones, con una primera oscilación más duradera que el resto (Santos *et al.*, 1991).

La despolarización causada en la membrana abre los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje de tipo L (VDCC) de la membrana plasmática de las células β . Esto produce un aumento de la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), que desencadena la exocitosis de los gránulos a través de la activación de proteínas quinasas que interaccionan con componentes de la maquinaria microtubular/exocítica. Durante este proceso se libera el contenido de insulina de las vesículas al medio extracelular

(Aizawa *et al.* 1998; Meda *et al.* Schuit, 2013), lo que da cuenta de la primera fase de la GSIS (**Fig. 7**). Finalmente, la apertura de los canales de K^+ dependientes de voltaje (K_v) restablece los potenciales de acción hasta su estado basal, limitando la entrada de Ca^{2+} y cesando la liberación de insulina.

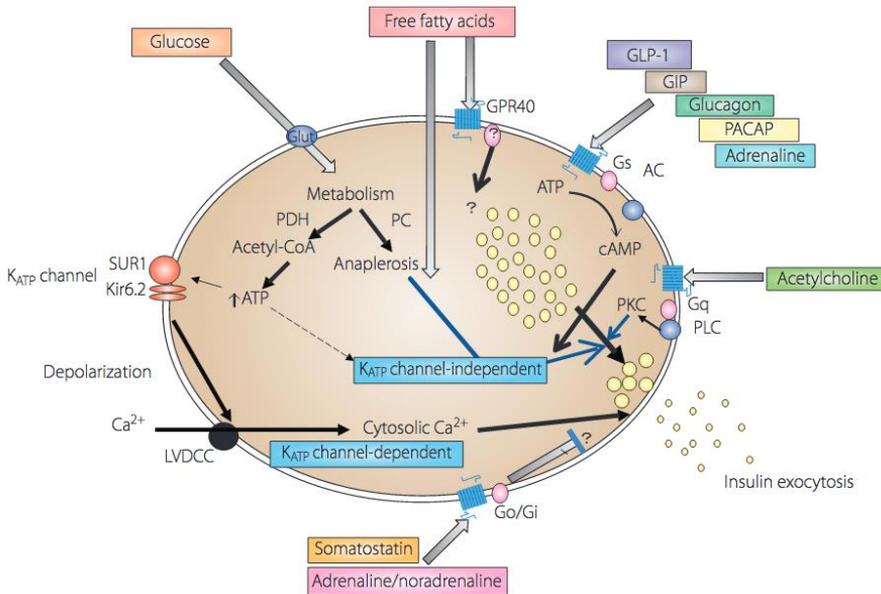


Figura 7. Vías de señalización responsables de la exocitosis de insulina en una célula β pancreática durante la primera fase (dependiente de los canales de K_{ATP}) y la segunda fase (independiente de los canales de K_{ATP}) de la GSIS. Komatsu *et al.*, 2013.

1.2.2 Segunda fase de la GSIS: mecanismo de liberación de insulina independiente de los canales de K_{ATP}

La actividad eléctrica generada por los canales K_{ATP} , el flujo de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VDCC) y el aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ eran considerados los mecanismos exclusivos de la GSIS hasta 1992. En ese mismo año, los trabajos de Sato *et al.*, 1992, Gembal *et al.*, 1992, y otros autores describieron una serie de vías de señalización intracelulares alternativas que participan también en la secreción de insulina, y que se consideraron responsables de la segunda fase de la respuesta bifásica de la insulina. Desde entonces han sido muchos los mecanismos propuestos y los metabolitos que se han relacionado con la liberación de insulina, algunos de los cuales se comentarán a continuación.

De esta forma, el metabolismo oxidativo de los carbonos de la glucosa a través de reacciones citosólicas y muy particularmente mitocondriales genera, además de ATP,

metabolitos que amplifican la secreción de la insulina (Wang *et Thurmon*, 2009; Heart *et al.*, 2006). Se ha demostrado además que, segundos mensajeros como el AMP_c y el GMP_c producidos durante la secreción de insulina potencian su liberación (Tamarina *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2008); si bien este efecto parece ser dependiente de especie como otros muchos autores han publicado (Grill *et Cerasi*, 1973; Charles *et al.*, 1975; Sharp, 1979; Persaud *et al.*, 1990; Christie *et Ashcroft*, 1984; Yaekura *et al.*, 1996; Ammala *et al.*, 1993; Jones *et al.*, 1992).

Asimismo, se ha descrito que secretagogos como GLP-1 (péptido similar al glucagón 1), (Gefel *et al.*, 1990), GIP (polipéptido inhibidor gástrico) (Dachicourt *et al.*, 1996) ó PACAP (péptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria) (Klinteberg *et al.*, 1996) actúan vía AMP_c, incrementando la producción de insulina.

De igual forma, otros agentes como los agonistas muscarínicos, los ésteres de forbol y agonistas colinérgicos facilitan la liberación de insulina vía proteína quinasa C (PKC) (MacDonald *et Fahien* 1988; Jones *et al.*, 1991).

La secreción de insulina también puede ser estimulada por ciertos aminoácidos como la alanina (Sener *et Malaisse*, 2002) o la leucina (Zhou *et al.*, 2010). De estos dos aminoácidos, sólo la leucina es capaz de estimular la secreción de insulina de los islotes en ausencia de glucosa (Sener *et Malaisse*, 2002; Li *et al.*, 2003). Otros aminoácidos como la alanina, ya comentada, o la glutamina estimulan la liberación de insulina, pero su acción parece estar condicionada a la presencia de leucina (Sener *et Malaisse*, 2002; Zhou *et al.*, 2010).

Ácidos grasos libres (FFA), como el palmitato y el oleato se han propuesto también como potenciadores de la GSIS, resaltándose la importancia de la señalización a través del receptor GPR40 de la superficie celular de las células β en el proceso (Itoh *et al.*, 2003; Ferdaoussi *et al.*, 2012).

Además de manifestar un efecto directo sobre la secreción de insulina de la célula β , la propia glucosa parece ejercer también una acción indirecta al estimular el proceso de exocitosis en las células β sobre las que actúa y a poblaciones de células β y δ vecinas, lo que favorece la co-secreción de otras hormonas del islote y de diferentes moléculas que permiten una regulación autocrina y paracrina del proceso como ya hemos comentado en el apartado 1.2 (ver **Fig. 5**) (Nadal *et al.*, 1999; Gopel *et al.*, 2000). Además, determinados neurotransmisores como la noradrenalina o ciertos neuropéptidos liberados por las fibras nerviosas tienen un papel muy relevante en el proceso de liberación de insulina por las células β (Rodríguez-Díaz *et al.*, 2011).

1.3 EL Ca^{2+} INTRACELULAR EN LA CÉLULA β

La actividad biológica de las células β se estima comúnmente midiendo los cambios en la concentración de calcio libre intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), en los islotes de Langerhans. Dichos cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ están altamente sincronizados, entre las diferentes células β del islote, creando un sincitio funcional. La sincronización es dependiente de uniones tipo gap formadas por canales de conexina 36 entre las diferentes células β (Sener *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003; Ravier *et al.*, 2005). Así, las células β están acopladas eléctricamente y muestran picos de Ca^{2+} como respuesta a elevaciones en la glucosa en sangre. Estos incrementos en el flujo de Ca^{2+} intracelular coinciden con la liberación pulsátil y paralela de insulina (Watts *et al.*, 2014; Gilon *et al.*, 2014; Krihnan *et al.*, 2015) por lo que la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ juega un papel clave a la hora de sincronizar el estímulo producido por la glucosa y la liberación de la insulina.

La medida de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, utilizando sondas fluorescentes sensibles a Ca^{2+} , con la ayuda del microscopio confocal y el empleo de técnicas inmunohistoquímicas ha permitido estudiar la respuesta de los islotes pancreáticos a la glucosa.

Así, al pasar islotes de Langerhans de ratón de 3mM a 11mM de glucosa, éstos responden con una primera elevación del Ca^{2+} intracelular el cual permanece elevado durante unos 2-3min, para luego caer de forma oscilatoria hasta llegar a un nivel basal ligeramente mayor que el que había en la situación inicial con glucosa 3mM (Gomis *et al.*, 1996). La frecuencia de las oscilaciones está comprendida entre 2 y 5 min^{-1} . A medida que la concentración de glucosa se incrementa también lo hace la duración de las oscilaciones, hasta que finalmente se observa un aumento sostenido del Ca^{2+} intracelular cuando la concentración de glucosa es superior a 22mM. La amplitud de las oscilaciones de Ca^{2+} a altas concentraciones de glucosa, en células β individuales de islotes humanos ($0.45 \pm 0.02\text{min}^{-1}$) es más pequeña que en ratones. Además, aunque los pulsos de Ca^{2+} llegan a sincronizarse en los primeros instantes muestran ligeros desfases, como se muestra en la **Fig. 8**, donde se representa la respuesta del Ca^{2+} intracelular de 4 células β pertenecientes a 2 agrupaciones (clusters) de células β constituidos por dos células distintas dentro del mismo islote, al pasar de 3mM a 11mM glucosa.

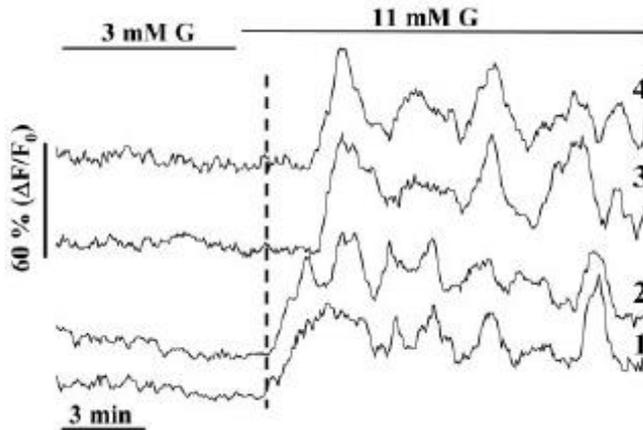


Figura 8. Oscilaciones del Ca^{2+} intracelular en 2 agrupaciones (clusters) de células con 2 células β individuales cada uno (1-2 y 3-4) dentro del mismo islote. Se representa la respuesta del Ca^{2+} intracelular de las 4 células β , al pasar de 3mM a 11mM de glucosa. Los islotes fueron marcados con la sonda fluorescente Fluo-3 y las señales de Ca^{2+} se obtuvieron empleando microscopía confocal (Quesada *et al.*, 2006).

A pesar de la heterogeneidad existente entre las células β individuales de un mismo islote (Salomon *et Meda*, 1986; Kiekens *et al.*, 1992; Pipeleers, 1992), una vez se encuentran localizadas dentro de él, se acoplan y actúan como un sincitio en términos de actividad eléctrica y de Ca^{2+} intracelular (**Fig. 8**) (Santos *et al.*, 1991; Quesada *et al.* 2006). Esto hace que la señal de Ca^{2+} sea la suma de todas las señales producidas por las células del islote y que ésta pueda ser detectada.

1.4 CASCADA DE SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR LA INSULINA

La señalización mediada por la insulina afecta a la actividad de tejidos metabólicamente activos tales como el hígado, el músculo esquelético, el tejido adiposo y el propio islote pancreático a fin de disminuir los niveles de glucosa en plasma. Estos efectos están mediados a través del receptor de insulina. Este receptor, tras la unión de la insulina, sufre un cambio conformacional en sus subunidades α y β que estimula la actividad tirosina quinasa intrínseca del receptor, lo que conduce a su propia autofosforilación. El receptor autofosforilado a su vez lleva a cabo la fosforilación de un número de proteínas de señalización denominadas moléculas sustrato del receptor de insulina (IRS) (Rhodes *et White*, 2002; Tatulian, 2015). En total, han sido identificadas en humanos 5 IRS (IRS-1, -2, -4, -5 y -6) (Fritsche *et al.*, 2008). De las cinco isoformas, IRS-1 y IRS-2 han recibido el mayor interés en relación al

mantenimiento de la homeostasis de la glucosa, ya que alteraciones en su expresión generan resistencia periférica a la insulina y el bloqueo de IRS-2 en células β conduce al desarrollo de diabetes tipo 2 (Sajan *et al.*, 2015). La activación de IRS1/2 desencadena la activación de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), que a su vez activa a la diana en mamíferos de la rapamicina (mTOR), la proteína quinasa C (PKC) y la quinasa Akt/PKB (**Fig. 9**). Por su parte, AMPK inhibe la vía de señalización mTORC1 a través de la activación de TSC2, modulando así la actividad de esta importante vía. Asimismo, la activación continua o constitutiva de la vía mTORC1 atenúa la actividad de Akt vía inhibición de IRS1, fenómeno molecular que parece estar detrás de la resistencia a la insulina (Tremblay *et al.*, 2001). La activación del receptor de insulina también conduce a la activación de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) y a las cascadas de señalización CAP/Cbl (Giorgino *et al.*, 2005; Krook *et al.*, 2009; Fritsche *et al.*, 2008) que participan en la movilización del transportador de glucosa GLUT4 a la membrana. Por otro lado, la expresión de IRS-2 en la célula β y, por tanto, la señalización a través de la vía Akt/PKB, es dependiente de la activación, inducida por glucosa, de la vía de señalización AMPK/CREB, la cual juega un papel muy importante en la plasticidad de la célula β (Dalle *et al.*, 2011) requiriéndose la función de CREB para una correcta homeostasis de la glucosa y para la supervivencia celular de los islotes pancreáticos (Jhala *et al.*, 2003; Persaud *et al.*, 2011).

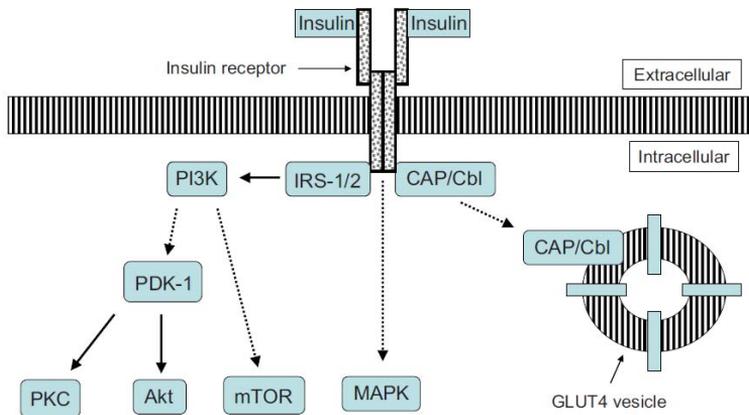


Figura 9. Esquema simplificado de la señalización intracelular mediada a través del receptor de insulina. Tras la unión de la insulina, el receptor cambia su conformación y se autofosforila, lo que facilita la unión y activación por fosforilación de otras proteínas (IRS-1/2, MAPK y CAP/Cbl) empleando la actividad tirosina quinasa intrínseca del mismo. Las flechas continuas representan una activación directa mientras que las flechas discontinuas indican diferentes pasos hasta la activación de las respectivas proteínas (Giorgino *et al.*, 2005; Krook *et al.*, 2009; Fritsche *et al.*, 2008; Tatulian, 2015).

Como puede deducirse de lo expuesto anteriormente, Akt/PKB, AMPK, AMP α /CREB y mTOR son cuatro vías de señalización intracelular, interconectadas entre sí, muy importantes en la regulación mediada por insulina, y que han sido estudiadas en mayor o menor medida en la presente tesis doctoral en relación a la señalización cannabinoide en los islotes pancreáticos.

- La proteína quinasa Akt, también conocida como PKB, es una serina/treonina quinasa que participa en múltiples procesos celulares como el metabolismo (de la glucosa fundamentalmente), la apoptosis, la angiogénesis, la proliferación, la transcripción y migración celular. La proteína Akt, descubierta en la década de los 90, pertenece a la familia de proteínas quinasas denominada AGC, conformada por tres tipos de isoformas; Akt1 (PKB α), Akt2 (PKB β) y Akt3 (PKB γ), codificadas por genes distintos (Hemmings *et Restuccia*, 2012; Manning *et Cantley*, 2007; Toker, 2012). Las tres isoformas de Akt se caracterizan fundamentalmente porque son activadas por la proteína fosfo-inositol-3-quinasa (PI3-K) en respuesta a una gran variedad de factores de crecimiento u hormonas como la insulina (Yuan *et Cantley*, 2008). El mecanismo de activación de Akt se resume a continuación (**Fig. 10**) (Hers *et al.*, 2011): una vez activada PI3K, esta quinasa fosforila la posición 3 de los fosfolípidos, fosfatidilinositol (PI), fosfatidilinositol 4-fosfato (PI(4)P), y fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato (PI(4,5)P₂) para generar PI(3)P, PI(3,4)P₂, y PI(3,4,5)P₃, respectivamente. Estos fosfolípidos actúan como segundos mensajeros que posibilitan la activación de Akt después de que ésta se una a ellos a través de sus dominios PH (*Pleckstrin Homology*). Los dominios PH son secuencias peptídicas de 100 a 120 aminoácidos que fueron reconocidos por primera vez en la proteína pleckstrina (7) y que forma parte de muchas proteínas transductoras de señales, además de Akt, confiriéndoles propiedades de adhesión a la membrana plasmática. En concreto, el dominio PH de Akt1 tiene una alta selectividad sobre los fosfolípidos PI(3,4)P₂ y PI(3,4,5)P₃, pero sólo PI(3,4)P₂ la activa provocando su reclutamiento hacia la membrana plasmática. Esta interacción entre el dominio PH de Akt y PI(3,4)P₂ induce un cambio conformacional que ocasiona que el residuo Thr308 sea expuesto y pueda ser fosforilado por la proteína PDK-18,9. La activación completa de Akt se lleva a cabo mediante una segunda fosforilación sobre el residuo Ser473 mediante la proteína PDK-2 o el complejo mTORC2, tal y como puede observarse en el esquema de la **Fig. 10**. Una vez fosforilada y activada, Akt se reubica en diferentes localizaciones subcelulares donde fosforila a otras proteínas, tales como GSK-3, BAD, MDM2, Caspasa-9, mTOR, FKHR y AFX, entre otras. La quinasa Akt se comporta como un factor antiapoptótico que

promueve la proliferación celular, crecimiento y supervivencia, así como la formación de tumores. Las tres isoformas de Akt están activadas y/o tienen su expresión incrementada en una gran variedad de tumores humanos, entre los cuales están el adenocarcinoma gástrico, el cáncer de mama, el de ovarios, páncreas, próstata y el de pulmón (Toker et Marmioli, 2014).

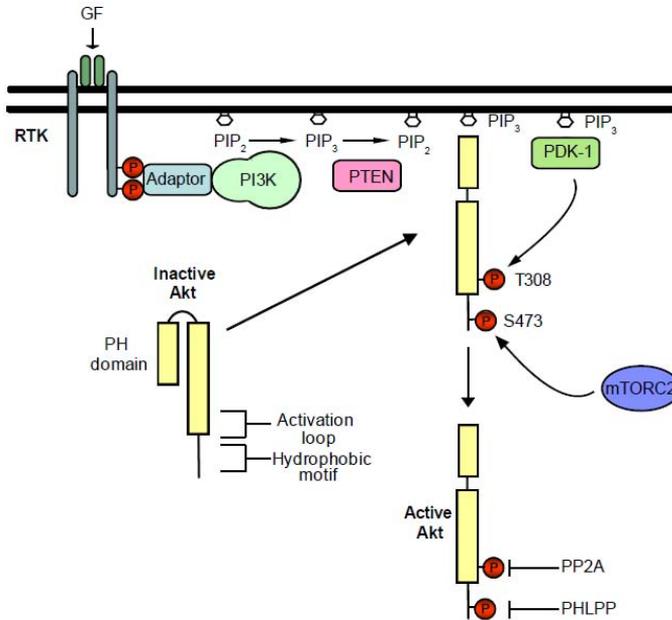


Figura 10. Activación y regulación de Akt. El receptor tirosina quinasa (RTK) es activado por la unión de factores de crecimiento (GF) en el dominio extracelular. Esto conlleva la autofosforilación del receptor y un aumento en la actividad quinasa. La PI3K (clase I) se une directamente al receptor activado o mediante una proteína adaptadora. La PI3K fosforila al PIP₂ formando PIP₃, acción que puede ser revertida por la fosfatasa con homología a tensina (PTEN). Akt se mantiene inactiva a través de una interacción intramolecular entre los dominios PH y quinasa. Sin embargo, la interacción entre el dominio PH y PIP₃ induce un cambio conformacional en Akt que permite a la proteína PDK-1 fosforilar a Akt en el residuo de Thr308 promoviendo su activación. La desfosforilación de este residuo es regulada por la proteína fosfatasa 2A (PP2A). mTORC2 fosforila el residuo Ser473, mientras que media su desfosforilación la fosfatasa PHLPP (Hers et al., 2011).

- La proteína CREB (*cAMP response element-binding*, en inglés) fue descrita por primera vez como un factor de transcripción de respuesta al AMP_c en 1987. La proteína CREB se une a secuencias del DNA conocidas como "elementos de respuesta al AMP_c" o CRE (*cAMP response element*, en inglés). Mediante esta unión, regula la transcripción de numerosos genes, entre los que se encuentran, C-Fos, la neurotrofina BDNF (brain-derived neurotrophic factor), tirosina hidroxilasa, somatostatina, encefalina, factor de crecimiento nervioso, hormona de liberación de

corticotropina, péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1), polipéptido inhibidor gástrico (GIP), polipéptido activador de la adenilil ciclasa de pituitaria (PACAP), o el factor de crecimiento insulínico (IGF-1), entre otros (Dalle *et al.*, 2011). Muchos estudios han mostrado que CREB está implicado en una amplia gama de procesos biológicos, tales como el metabolismo de la glucosa, la supervivencia celular, y funciones neurales complejas como el aprendizaje y la memoria, por ejemplo.

La activación de la proteína CREB se lleva a cabo tras la activación de receptores de membrana que transducen señales generadoras de segundos mensajeros tales como el AMP_c o el Ca²⁺; los cuáles, a su vez, activan a proteínas quinasas A (PKA). Estas proteínas se desplazan desde el citosol al interior del núcleo, donde, pueden fosforilar y activar a CREB y a otras muchas dianas. Una vez activado, como P-CREB, éste se une a regiones CRE en el DNA. Tras esta unión de P-CREB a los lugares CRE son reclutadas otras proteínas que lo coactivan (CBP o proteína de unión a CREB) facilitando su acción transcripcional.

- La proteína AMPK (proteína quinasa activada por AMP), es un complejo enzimático que se activa en respuesta a un aumento en la relación AMP/ATP en la célula. Por ello, se considera un sensor energético y regulador clave del metabolismo. La proteína AMPK controla el metabolismo de la glucosa y el de los lípidos, e integra circuitos de señalización entre tejidos periféricos y el hipotálamo regulando la ingesta y el gasto energético de todo el organismo (Carling 2004; Hardie *et al.* Sakamoto, 2006). Su activación tiene lugar a través de la quinasa LKB1 y es capaz de fosforilar enzimas que participan en el consumo y la generación de ATP. La activación de AMPK se produce por un amplio abanico de estreses metabólicos entre los que se incluyen, ausencia de glucosa, ejercicio, hipoxia, isquemia, estrés oxidativo y estrés hiperosmótico. A excepción de éste último, todos los demás tipos de estrés, están relacionados con un aumento en la relación AMP: ATP celular; esto es, con un bajo nivel de energía celular. Una vez que AMPK es activada, inhibe rutas anabólicas (biosintéticas) y otros procesos que consumen ATP, y activa rutas catabólicas que lo generan, todo contribuye a restablecer y mantener el balance energético celular. Desde que se relacionó a AMPK con el control metabólico, señalándola como una diana crucial de los agentes antihiper glucémicos, los estudios sobre esta enzima han aumentado exponencialmente, habiéndose propuesto como potencial diana terapéutica para el tratamiento de la diabetes, el cáncer (Luo *et al.*, 2005) o la obesidad (Kola *et al.* 2006).

- Las siglas mTOR hacen referencia a la llamada “diana en mamíferos de la

rapamicina”, molécula ésta última, que actúa como su inhibidor. La proteína mTOR es una Ser/Thr proteína quinasa altamente conservada, localizada en el citosol celular. Lo que se conoce como mTOR es en realidad la asociación de dos complejos proteicos distintos bioquímica y funcionalmente conocidos como mTORC1 y mTORC2, según las subunidades proteicas que lo conforman. En este trabajo, hemos estudiado el complejo mTORC1 de los islotes de Langerhans, que promueve el crecimiento celular de las células β y modula la secreción de insulina.

El complejo proteico mTOR se comporta fisiológicamente como un sensor metabólico que se activa en respuesta a señales extracelulares tales como nutrientes, factores de crecimiento y hormonas como la propia insulina (Howell *et al.*, 2011; Sengupta *et al.*, 2010; Zoncu *et al.*, 2011; Balcázar *et al.*, 2009; André *et al.*, 2012). Existen un conjunto de proteínas que activan a mTORC1 que son conocidas como proteínas “upstream” de mTORC1. Por su parte, a las proteínas diana de mTORC1 se conocen como proteínas “downstream” de mTORC1 (**Fig. 11**).

A continuación, se hará un breve resumen de las principales señales, rutas y proteínas que activan a mTORC1. Así, el complejo mTORC1 se activa por proteína-G pequeñas como Rheb cuando éstas se activan al unirse el GTP (Garami *et al.*, 2003; Saucedo *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2006). La proteína Rheb regula su propia función a través de su actividad GTPasa intrínseca y por los complejos 1 y 2 supresores de tumores (TSC1/2) (Garami *et al.*, 2003; Saucedo *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2006) los cuáles causan su inhibición. En respuesta a factores de crecimiento, hormonas y nutrientes se activan rutas de señalización que promueven la inactivación por fosforilación de TSC2, con lo que mTORC1 se activa. De esta forma, en respuesta a la insulina mTORC1 resulta activado por proteínas quinasas B (PKB/Akt) ó por ERK/RSK en el caso de factores de crecimiento. Nutrientes como la glucosa activan a mTORC1 mediante la inhibición de AMPK las cuales a su vez activan a las proteínas TSC1/2, y ciertos aminoácidos, lo hacen a través de proteínas GTPasas Rag.

Una vez que mTORC1 ha sido activado, el complejo fosforila y activa a sus dianas, las proteínas 4EBPs y S6K1, las cuales promueven la síntesis de proteínas, el crecimiento y la proliferación celular (Laplante *et al.*, 2012).

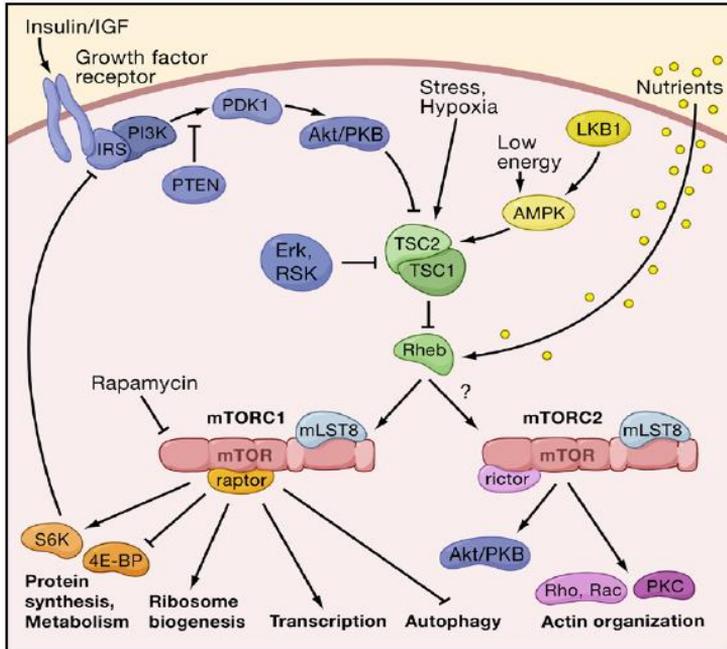


Figura 11. Vía de señalización intracelular de mTORC1 (upstream y downstream de mTORC1). Señales extracelulares como nutrientes, factores de crecimiento, y hormonas como la insulina van a activar a las proteínas upstream de mTORC1. A su vez, mTORC1 va a activar a sus proteínas downstream (Haissaguerre *et al.*, 2014).

En resumen, la supervivencia celular, proliferación y diferenciación están mediadas por la señalización a través de MAPK (proteína quinasas activadas por mitógenos), AKT y CREB, y el aumento en la síntesis de proteínas por mTOR (Giorgino *et al.*, 2005; Krook *et al.*, 2009; Fritsche *et al.*, 2008). Los cambios en el metabolismo son principalmente controlados por AKT aunque también puede estar implicada la señalización de la PKC (Giorgino *et al.*, 2005; Krook *et al.*, 2009; Leclercq *et al.*, 2007; Fritsche *et al.*, 2008). Los dos efectos más importantes de la señalización de la insulina en los tejidos periféricos (con respecto a la retirada de glucosa de la sangre) son la reducción en la producción de la glucosa hepática y el aumento de la captura de glucosa (por translocación de GLUT4 a la membrana plasmática) en el músculo esquelético y el tejido adiposo (Bouzakri *et al.*, 2006; Fritsche *et al.*, 2008; Leney *et al.*, 2009). En general, la señalización de la insulina desencadena la regulación del metabolismo energético, la expresión genética y los efectos mitogénicos, pasando de un estado catabólico a un estado anabólico.

1.5 LA DIABETES TIPO 2

La diabetes tipo 2 es un desorden metabólico caracterizado por hiperglucemia resultado de la combinación de múltiples factores entre los que se encuentran la resistencia a la insulina por parte de sus tejidos diana y de la incapacidad de las células β para producir una cantidad suficiente de insulina que mantenga la normoglucemia en sangre (Bowe *et al.*, 2014). Normalmente, la enfermedad se inicia con la aparición de resistencia periférica a la insulina (Kahn *et al.*, 2006; Muoio *et al.*, 2008; Pajvani *et al.*, 2015) para, posteriormente, aparecer una disfunción progresiva de las células β (Kahn, 2001), y una clara reducción de la masa de las mismas (Butler *et al.*, 2003; Deng *et al.*, 2004).

Desde el punto de vista clínico, se considera que una persona es diabética cuando concurren en ella alguna o todas de las siguientes circunstancias: a) posesión de niveles de glucosa sanguínea en ayunas mayores o iguales a 7.0mM (126mg/dl); b) la posesión de niveles de glucemia mayores o iguales a 11.1mM (200mg/dl) tras 2h de la realización de una prueba de tolerancia oral a la glucosa, o c) poseer niveles de hemoglobina glicosilada (HbA1c) mayores o iguales a 48mM (≥ 6.5 DCCT %). Datos estadísticos-epidemiológicos mostraron que la diabetes tuvo una incidencia a nivel mundial de 382 millones de personas afectadas en el año 2013, aunque se prevé que esta cifra alcance los 592 millones en 2035 (Forouhi *et al.*, 2014). El 5-10% del total de estos 382 millones de sujetos presentan diabetes tipo 1, que actualmente se tratan principalmente, con inyecciones subcutáneas de insulina recombinante o con bombas exógenas de infusión de la misma que suplan su falta de producción por la destrucción autoinmune de las células β . El porcentaje restante de individuos (90-95%), muestran diabetes tipo 2, en la mayoría de los casos asociada a fenómenos de obesidad (Al-Safar *et al.*, 2015; Kawakami *et al.*, 2015).

A pesar de que la resistencia a la insulina es una característica típica de la diabetes tipo 2, ésta no parece ser la causa responsable directa de la enfermedad. Así, se ha estimado que sólo el 15-20% de los individuos que presentan resistencia a la insulina crónica llegan a desarrollar diabetes tipo 2 (Butler *et al.*, 2003; Deng *et al.*, 2004; Polonsky, 2000). Ello se ha explicado más bien por la capacidad que tienen las células β para poner en marcha mecanismos compensatorios que incrementan su masa y su funcionalidad (Butler *et al.*, 2003; Deng *et al.*, 2004; Hull *et al.*, 2005) con el fin de mantener la homeostasis de la glucosa. Se considera que los individuos que adquieren un fenotipo de diabetes tipo 2, habiendo sobrepasado la máxima capacidad de expansión de la masa de células β , desarrollan una disfunción de la

célula β a la que posiblemente contribuyen la deposición de proteínas amiloides en los islotes, el estrés oxidativo, la inflamación, el exceso de ácidos grasos y la carencia del efecto de las incretinas (Taylor, 2013).

La hiperglucemia crónica presente en la diabetes tipo 2 causa devastadoras complicaciones “macro” y “micro” vasculares que son las responsables de la reducción en la calidad de vida, el incremento en la morbilidad, la prematura mortalidad y un considerable coste sanitario. En concreto, esta heterogénea enfermedad afecta a tejidos como el sistema nervioso central, aumentando el riesgo de disfunción cognitiva y demencia, al sistema cardiovascular, produciendo enfermedad isquémica del corazón y derrame cerebral, a la vista, siendo la mayor causa de ceguera no traumática, y al riñón, causando insuficiencia renal. La diabetes tipo 2 tiene también un componente genético, siendo resultado de la combinación de los factores ambientales (estilo de vida sedentario, alimentación...) y la susceptibilidad genética a desarrollar obesidad y/o diabetes, como sucede con otras enfermedades de gran prevalencia como el cáncer.

Junto a la disfunción de las células β , cada vez son más numerosos los estudios que sugieren que la disfunción de las células α (secretoras de glucagón) durante la obesidad, podría estar también implicada en la fisiopatología de la diabetes tipo 2 (Merino *et al.*, 2015). La secreción excesiva de glucagón de las células α contribuye a la hiperglucemia persistente mediante el incremento de la producción hepática de glucosa en ayunas y una menor reducción después de la ingesta (Spellman, 2007; Burcelin *et al.*, 2008). Por el contrario, durante la hipoglucemia, la secreción de glucagón parece estar atenuada en la diabetes tipo 2. Además, la inhibición inducida por glucosa de glucagón se suprime lo que conduce a un gran aumento de la glucemia (hiperglucemia) debido posiblemente a una desregulación de la gluconeogénesis hepática (Burcelin *et al.*, 2008; Quesada *et al.*, 2008).

En la actualidad, el tratamiento de la diabetes tipo 2 se aborda inicialmente promoviendo en los pacientes cambios en sus estilos de vida, como la realización de una actividad física regular, eliminación del tabaco y alcohol, y mediante el control de la dieta. Está documentado, que sólo estos cambios en los hábitos de vida son capaces de revertir la diabetes tipo 2 cuando ésta se halla en estadios no muy avanzados (Lim *et al.*, 2011). Para los casos en que este tipo de intervención no consigue un adecuado control glucémico, existen tratamientos farmacológicos encaminados principalmente a potenciar la secreción de insulina estimulada por glucosa (los de la familia de las sulfonilureas, como la glibenclamida), y a disminuir las

tasas de gluconeogénesis hepática (como la metformina). Otros tratamientos más recientes son los que emplean agonistas de GLP-1, inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4) o inhibidores del cotransportador sodio-glucosa tipo 2 (SGLT2). Respecto a los agonistas de GLP-1, como el liraglutida, aparte de potenciar la secreción de insulina, estos compuestos tienen un efecto trófico sobre el islote pancreático, preservando la masa de células β y disminuyendo la secreción de glucagón. Los inhibidores de la DPP-4, enzima que degrada las incretinas GLP-1 y GIP, aumentan la vida media de éstas, incrementando así su acción beneficiosa sobre la producción de insulina. Por otro lado, SGLT2 es una proteína de transporte sodio-glucosa que se expresa en las células del túbulo proximal de las nefronas del riñón. En circunstancias normales, este cotransportador impide que la glucosa se elimine a través del mismo. En este sentido, el uso de inhibidores de SGLT2 puede resultar beneficioso para corregir la hiperglucemia asociada a la diabetes tipo 2. Finalmente, es de destacar el creciente empleo de la denominada cirugía metabólica como tratamiento anti-diabético. Este tratamiento quirúrgico, idéntico a la cirugía bariátrica practicada en individuos obesos mórbidos, es capaz de revertir la diabetes tipo 2 en pacientes con obesidad asociada y con un inadecuado control glucémico (Taylor, 2013).

1.6 ALTERACIONES EN VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR EN ISLOTES PANCREÁTICOS Y OTROS TEJIDOS DURANTE LA DIABETES

1.6.1 Alteraciones de la vía AKT/PKB en diabetes

Como hemos comentado anteriormente, existen tres isoformas de Akt (Akt1, Akt2 y Akt3), cada una de ellas está involucrada en procesos celulares distintos. Así, Akt1 regula la supervivencia celular (Matsui *et al.*, 2005), Akt2 controla el metabolismo (DeBosch *et al.*, 2006) y Akt3 el desarrollo cerebral (Tschopp *et al.*, 2005).

La señalización mediada por Akt juega un papel central en la captación de glucosa por parte de los tejidos metabólicamente activos que responden a la insulina, como el músculo y el tejido adiposo (facilitando la translocación de los transportadores GLUTs a la membrana plasmática) y, además, también, en presencia de insulina inhibe la gluconeogénesis hepática, regulando negativamente a las dos enzimas claves que participan en el control de este proceso, la fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa y la glucosa-6-fosfatasa (Steinberg *et al.*, 2009). Debido a su papel crucial en el metabolismo glucídico y lipídico, la alteración en la vía de señalización de Akt

contribuye a generar diabetes. En este contexto, ratones *knockout* (KO) para la isoforma Akt2 tienen reducido el transporte de glucosa en el músculo esquelético y el tejido adiposo y muestran hiperglucemia (Garofalo *et al.*, 2003). Además, una mutación dominante en el gen *AKT2* (R274H) en humanos causa hiperinsulinemia severa y diabetes, confirmando el papel relevante de Akt en el control del metabolismo (George *et al.*, 2004). Además, la delección de las isoformas *Akt1* y *Akt2* causa intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina y altera la respuesta a la insulina en el hígado (Mackenzie *et Elliott*, 2014).

Akt no sólo juega un papel clave en el transporte de glucosa en los tejidos diana de la insulina, sino que también, estimula la supervivencia y la proliferación de las células β en el páncreas endocrino (Elghazi *et al.*, 2007). Experimentos realizados *in vitro* con células de insulinoma, e islotes pancreáticos aislados de animales, han demostrado que la activación de Akt a partir de glucosa, insulina, IGF-1 y GLP-1 es el principal desencadenante de los efectos anti-apoptóticos de estas moléculas (Srinivasan *et al.*, 2002; Ohsugi *et al.*, 2005; Brubaker *et Drucker*, 2004; Dickson *et Rhodes*, 2004).

La alteración en el transporte de glucosa en la diabetes podría ser debida a una reducción en la señalización de Akt causada por elevados niveles circulantes de ácidos grasos libres (FFA) y de citoquinas inflamatorias. Uno de los mecanismos que han sido descritos, por los que los FFA y las citoquinas contribuyen a la resistencia a la insulina es la inducción de la fosforilación de la Ser307 de IRS-1 (Le Marchand-Brustel *et al.*, 2003). De esta manera, la señalización mediada a través de los IRS-1 se ve reducida, disminuyendo la activación de PI3K y Akt. Otro mecanismo por el que los FFA y la citoquinas podrían ocasionar resistencia a la insulina sería a través de la activación de fosfatasa que regulan negativamente la cascada de señalización de la insulina. Además, los FFA elevan la producción de ceramidas que actúan como segundos mensajeros activando rutas que disminuyen la sensibilidad a la insulina, como por ejemplo activando a la fosfatasa 2A (PP2A), la cual, desfosforila e inhibe a Akt, reduciendo el transporte de glucosa. También se ha descrito, que el TNF- α media la aparición de resistencia a la insulina en el músculo activando a la fosfatasa PTP1B (implicada en la desfosforilación del receptor de insulina), reduciendo la señalización de Akt (Hers *et al.*, 2011).

El sustrato Akt de 160 kDa (AS160), también conocido como TBC1D4, tiene un papel relevante bien establecido en la translocación de los transportadores GLUT-4, desde vesículas intracelulares a la membrana plasmática, inducida por Akt/PKB en el músculo esquelético. Tras su activación, Akt/PKB fosforila a AS160, lo que conduce a

una reducción en la actividad Rab-GTPase, y con ello, se promueve la translocación de GLUT-4 y la captación de glucosa. Por lo tanto, cualquier defecto en la vía de señalización PI3 quinasa/Akt/AS160 en última instancia, reducirá la captación de glucosa en el músculo esquelético. De forma similar, la delección hepática de la isoforma Akt1 y Akt2 provoca intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina y una respuesta transcripcional defectuosa de la insulina a la alimentación en hepatocitos (Mackenzie *et Elliott*, 2014).

De acuerdo con lo anteriormente comentado, la inhibición de la inositol hexafosfato quinasa 1 (IP6K1) que regula negativamente a Akt, podría mejorar la acción periférica de la insulina y la función hepática según muestran estudios realizados con ratones *KO* para IP6K1. La enzima IP6K1 forma pirofosfato de inositol 7 (IP7) a partir de la fosforilación de IP6; éste, a su vez, se une al dominio PH de Akt impidiendo su translocación a la membrana plasmática, y con ello, la fosforilación de esta molécula por la quinasa PDK1. Los ratones *KO* para IP6K1, presentan una elevada actividad de Akt en respuesta a la estimulación de la insulina y un transporte de glucosa incrementado en el músculo esquelético. A su vez, tienen disminuido los niveles de insulina en sangre, y manifiestan una mejora en la sensibilidad a esta hormona. Interesantemente, también muestran un fenotipo delgado, relacionado con un incremento en la β -oxidación de los ácidos grasos y una reducida adipogénesis (Mackenzie *et Elliott*, 2014). A pesar de lo comentado, otros autores sugieren que la disminución en los niveles en sangre de insulina de los ratones *KO* de IP6K1 reflejan una pérdida de la función de la célula β (Bhandari *et al.*, 2008) y que IP7 incrementa la secreción de insulina por parte de este tipo celular (Illies *et al.*, 2007).

Los ratones *KO* de IP6K1, a pesar de mostrar bajas concentraciones de insulina, no manifiestan características típicas de la diabetes, presentando niveles basales de glucosa y hemoglobina glucosilada normales, y reducción de peso a las 10 semanas (Chakraborty *et al.*, 2010). Estos datos realzan los efectos positivos de la inhibición de la IP6K1 sobre la sensibilidad a la insulina por parte de los tejidos periféricos debido a un incremento en la actividad de Akt (Mackenzie *et Elliott*, 2014).

En contraposición a todos estos datos obtenidos en distintos estudios sobre alteraciones en proteínas activadoras o dianas de Akt, otros autores han encontrado que la actividad de Akt en el músculo esquelético de sujetos con resistencia a la insulina no está alterada (Storgaard *et al.*, 2001; Kruszynska *et al.*, 2002; Storgaard *et al.*, 2004; Bandyopadhyay *et al.*, 2005).

Otros estudios también han relacionado la pérdida de la actividad de Akt con la acción de la hormona leptina. Así, ratones *KO* para *Akt1* y *Akt2* muestran niveles circulantes de leptina reducidos y la restauración de los niveles de leptina mantiene la homeostasis de la glucosa en animales diabéticos *KO* de Akt, sugiriendo que la leptina estimula la acción de la insulina en estos animales (Hay, 2011).

Por último, Akt regula positivamente la actividad del factor de transcripción CREB, fosforilándolo directamente (Du *et Montminy*, 1998). La fosforilación de CREB por Akt induce la unión de proteínas accesorias que son necesarias para la transcripción de genes que mantienen la supervivencia celular como *bcl-2* y *mcl-1* (Nicholson *et Anderson*, 2002; Inoki *et al.*, 2002; Kovacina *et al.*, 2003).

1.6.2 Alteraciones de la vía AMPK en diabetes

Como ya se ha comentado, la proteína AMPK es un sensor metabólico capaz de detectar niveles bajos de energía en la célula, esto es, cuando la relación AMP/ATP se halla elevada. De esta forma, favorece procesos que sintetizan ATP, como la β -oxidación de FFA, e inhibe aquellos que requieren ATP, como la síntesis de triglicéridos y de proteínas.

La proteína AMPK es una serina/treonina quinasa formada por tres subunidades; una subunidad catalítica (α), y dos subunidades reguladoras (β y γ). Cada subunidad tiene múltiples isoformas ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$), sumando un total de 12 posibles combinaciones heterotriméricas. Algunas isoformas son específicas de tejido, por ejemplo, la isoforma $\alpha 1$ predomina en el hígado y el tejido adiposo mientras que la $\alpha 2$ lo hace en el cerebro, corazón y músculo esquelético (O'Neill, 2013; Steinberg *et Kemp*, 2009).

La activación de AMPK requiere un incremento de la relación AMP/ATP y la fosforilación de la treonina 172 de la subunidad α , por una de las tres quinasas siguientes: la quinasa supresora de tumores tipo 1 del hígado (LKB1), la proteína quinasa β dependiente de Ca^{2+} y calmodulina (CaMKK β), o la quinasa tipo 1 activada por el factor de crecimiento β transformante (TAK1). AMPK presenta, también, un residuo de serina (Ser 485) en la subunidad $\alpha 1$ susceptible de ser fosforilada por Akt, proteína quinasa A (PKA), o por autofosforilación, en tejidos como el corazón, tejido adiposo y células musculares del endotelio, lo que conduce a su inhibición. De forma similar, AMPK puede ser inhibida a través de la fosforilación de la serina 491 de su

subunidad $\alpha 2$ por PKA, p70S6K (Dagon *et al.*, 2012) o por autofosforilación, en adipocitos, hipotálamo, corazón y células HEK293, e incluso por Akt (Horman *et al.*, 2006; Ning *et al.*, 2011).

Las funciones de AMPK en la regulación del metabolismo energético se resumen en la **Fig. 12**. En el músculo esquelético y cardíaco, la activación de AMPK incrementa la captación de glucosa, la oxidación de los FFA y la glucólisis. En el hígado, la actividad de la AMPK inhibe la síntesis del colesterol y la de los FFA y la gluconeogénesis. La lipólisis y la lipogénesis en el tejido adiposo son también inhibidos tras la activación de la AMPK. A su vez, en las células β del páncreas, disminuye la secreción de insulina (Coughlan *et al.*, 2014).

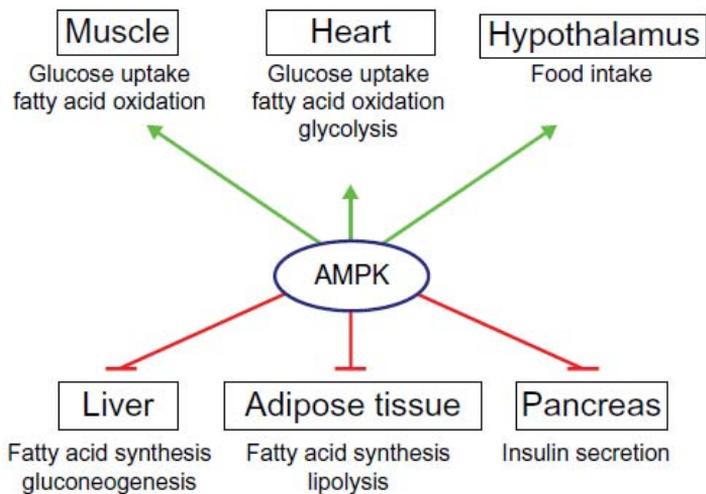


Figura 12. Funciones de la proteína AMPK en el control del metabolismo energético. La activación de AMPK (flechas verdes) estimula los procesos metabólicos que generan energía mientras que inhibe aquellos que la consumen (líneas rojas) (Coughlan *et al.*, 2014).

Numerosos estudios sugieren que la proteína AMPK se encuentra alterada en la diabetes tipo 2; la actividad de AMPK se encuentra disminuida en el músculo esquelético de modelos animales con fenotipo de síndrome metabólico (Ruderman *et al.*, 2004), en humanos con diabetes tipo 2 (Bandyopadhyay *et al.*, 2006) y, también, en el tejido adiposo de humanos obesos (Xu *et al.*, 2012).

En la actualidad, AMPK está considerada una diana terapéutica para tratar la diabetes tipo 2 y existen numerosos activadores de AMPK que son usados clínicamente para este fin, mejorando la sensibilidad a la insulina. Entre ellos, fármacos como la metformina, la rosiglitazona, pioglitazona y troglitazona, los cuales, activan a la AMPK

de forma indirecta. Otros activadores de la AMPK son los inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4, que previenen la degradación de GLP-1, la tienopiridina, los salicilatos, las moléculas PTI y C24, compuestos naturales y hormonas como la leptina y la adiponectina (Coughlan *et al.*, 2014).

1.6.3 Alteraciones de la vía mTOR en diabetes

Como se ha comentado anteriormente, mTORC1 es un sensor metabólico que se activa a partir de señales extracelulares tales como factores de crecimiento, hormonas y nutrientes. Asimismo, incrementa la masa y estimula a las células β en aquellas situaciones fisiológicas que así lo demandan, como es el caso de la hiperglucemia y la resistencia a la insulina. La glucosa, a través de la actividad de mTORC1, se comporta como un potente estimulador de la masa de las células β *in vivo* en roedores (Bernard *et al.*, 1998; Bonner-Weir *et al.*, 1989; Paris *et al.*, 2003; Topp *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2015). Estudios *in vitro* llevados a cabo con líneas de células β de ratón han demostrado además que la glucosa estimula la proliferación y la síntesis de proteínas de estas células a través de una vía sensible a la rapamicina y, por lo tanto, implica a mTORC1 (Xu *et al.*, 1998; Gómez *et al.*, 2004; Kwon *et al.*, 2004; Bartolomé *et al.*, 2010). Algunos autores han propuesto que la glucosa ejerce su acción activadora de mTORC1 en islotes y en líneas celulares de células β a través de la acción autocrina de la insulina (Xu *et al.*, 1998), y otros, a través de la activación de la proteína PKB y la inactivación de AMPK (Gleason *et al.*, 2007).

La activación de mTORC1 ejerce efectos estimuladores sobre procesos tales como: la replicación de la célula β a través de su diana 4EBP (Raught *et al.*, 2004; Laplante *et al.*, 2012); la expresión del gen de la preinsulina, a través de su diana STAT3 (Laubner *et al.*, 2005); la traducción del RNAm de IGF2 (Dai *et al.*, 2011); el metabolismo lipídico, a través de SREBP (Li *et al.*, 2010; Shimomura *et al.*, 1998; Shimomura *et al.*, 2000) y el tamaño de la célula β a través de la quinasa S6K1 (Pende *et al.*, 2000; Balcázar *et al.*, 2006), entre otros. Estos efectos han sido generalmente validados farmacológicamente mediante el uso del inhibidor de mTORC1 rapamicina, que ocasiona pérdidas de función y viabilidad en líneas celulares de células β y en islotes pancreáticos de roedores, indicando que el mantenimiento de la actividad de mTORC1 es crítico para la integridad estas células (Fabian *et al.*, 1993; Bell *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2006).

A pesar de lo comentado, es necesario indicar, que la hiperestimulación de mTORC1, por ejemplo mediante un excesivo consumo de nutrientes, podría conducir a la sobreactivación de su diana S6K1 (Cota *et al.*, 2008; Woods *et al.*, 2008), lo que provocaría un *feedback* negativo sobre los IRS, que ocasionaría una disminución de la señalización a través del receptor de insulina y de esta forma podría contribuir a la resistencia a la insulina y al estrés del retículo endoplásmico. Condiciones éstas que desencadenan la disfunción de la célula β y la progresión hacia la diabetes (Elghazi *et al.*, 2010; Um *et al.*, 2004; Ozcan *et al.*, 2008; Bartolomé *et al.*, 2014). Por tanto, y como resumen, puede afirmarse que la vía mTORC1 es importante para la respuesta de la célula β ante la hiperglucemia, siendo activada en esta condición, donde se demanda un incremento de la masa de células β . A su vez, esta vía participa en la fisiopatología de la diabetes, encontrándose desregulada, conduciendo su activación crónica al desarrollo de resistencia a la insulina.

1.6.4 Alteraciones de la vía cAMP/CREB en diabetes

Los trabajos de Riccio *et al.*, 1999, de Lonze *et al.*, 2002 y Mantamadiotis *et al.*, 2002, donde se sugiere que el factor de transcripción CREB desempeñaba una función primordial en la supervivencia de neuronas, activando genes antiapoptóticos como el gen *Bcl-2*, acrecentaron el interés por averiguar si CREB pudiera actuar también como un factor de supervivencia en otros tipos celulares, como por ejemplo en las células β pancreáticas.

Como se comentó en el apartado 1.2, GLP-1, secretado por los enterocitos, potencia la segunda fase de la secreción de insulina vía AMP_c, incrementando por tanto, la liberación de esta hormona en los islotes pancreáticos y favoreciendo la supervivencia y crecimiento de la célula β (Hui *et al.*, 2003). A su vez, el AMP_c activa a la proteína quinasa A que media la fosforilación de CREB y por tanto su activación y su capacidad para controlar la expresión de numerosos genes (González *et Montminy*, 1989). Del mismo modo, el factor de transcripción CREB es activado por el Ca²⁺ intracelular, de manera simultánea a la liberación de insulina por las células β , cuando los niveles de glucosa en sangre son elevados, promoviendo la supervivencia y expresión génica de las células β (Jhala *et al.*, 2003). Por tanto, las acciones derivadas del incremento del AMP_c y el Ca²⁺ convergen en el estímulo del factor de transcripción CREB en los islotes pancreáticos.

La capacidad de agonistas del receptor de GLP-1 para proteger a las células β de la

apoptosis a través de un mecanismo dependiente de AMP_c en modelos animales de diabetes (Drucker, 2003) llevó a pensar que el factor de transcripción CREB estaba involucrado en la regulación de genes pro-apoptóticos y/o de supervivencia celular de la célula β . Los estudios que vamos a describir a continuación, realizados en modelos de animales *knockout* para CREB y *knockdown* para esta proteína en líneas celulares (células INS-1E y MIN6), e islotes pancreáticos humanos confirmaron esta hipótesis.

De este modo, numerosos autores han demostrado cómo el factor de transcripción CREB no sólo promueve la supervivencia de los islotes pancreáticos, induciendo genes antiapoptóticos o proteínas quinasas que favorecen la proliferación celular, sino que, además, CREB colabora en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa, potenciando la secreción de insulina y su expresión se encuentra alterada en la diabetes tipo 2 (Jhala *et al.*, 2003; Persaud *et al.*, 2011; Costes *et al.*, 2009).

Los mecanismos intracelulares a través de los cuales el factor de transcripción CREB media sus efectos proliferativos y antiapoptóticos en la célula β están relacionados con una de sus dianas, el sustrato del receptor de insulina tipo 2 (IRS-2), que a su vez activa a la proteína Akt (en respuesta a la insulina y al factor de crecimiento insulínico tipo 1, IGF-1) (Jhala *et al.*, 2003). La inhibición de la actividad de CREB en células β de ratas conduce a un déficit en la liberación de insulina, intolerancia a la glucosa, disminución en la expansión en masa, incremento en la tasa de apoptosis y una notable reducción en la expresión de IRS-2 (Jhala *et al.*, 2003). Otros autores también sugieren que CREB regula la expresión de *Irs-2* en las células β a través de un mecanismo dependiente Ca²⁺ y activación de quinasas dependientes de Ca²⁺ y calmodulina (CaMK_{IV}) (Persaud *et al.*, 2011). Por otra parte, ratones *KO* para *Irs-2*, presentan una significativa reducción en la masa de células β , que precede al desarrollo de diabetes; mientras que la sobreexpresión de este gen en células β incrementó la supervivencia, el crecimiento y la proliferación celular (Hennige *et al.*, 2003). Como ya hemos sugerido, la incretina GLP-1 y agonistas del receptor GLP-1 como la exendina-4, también promueven la fosforilación, y por tanto, la activación de CREB (Jhala *et al.*, 2003) y de IRS-2 (Park *et Cho*, 2006).

Todos estos datos apoyan la idea de que la actividad del factor de transcripción CREB es esencial para la integridad funcional de la célula β (Jhala *et al.*, 2003; Jambal *et al.*, 2003; Sarkar *et al.*, 2007). Finalmente, indicar que CREB en su estructura primaria presenta una secuencia que es reconocida por el complejo proteasoma-ubiquitina, el cual, media su degradación en condiciones de glucotoxicidad en la célula β . Esto, limita sus actividades post-transcripcionales anti-apoptóticas, de mejora en la

sensibilidad a la glucosa, y de control de la transcripción de genes implicados en la síntesis de glucosa y secreción de insulina (Costes *et al.*, 2009).

1.7 ESTRÉS OXIDATIVO EN EL ISLOTE PANCREÁTICO Y DIABETES

El estrés oxidativo celular resulta del desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y/o de nitrógeno (RNS) y la neutralización de éstas por los tampones redox celulares y la actividad de otros sistemas antioxidantes. Las ROS como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), los radicales hidroxilo (OH^{\cdot}), y las especies reactivas de nitrógeno (RNS) como el óxido nítrico (NO) y el peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$), son moléculas que cuando aparecen en exceso pueden causar disfunción y muerte celular por alteración de vías metabólicas (Newsholme *et al.*, 2007 y 2009). Asimismo, causan daños en las membranas celulares y en moléculas importantes como el DNA, proteínas, etc. (Boveris *et al.*, 1972; Turrens, 1997; Jonhson *et al.*, 1999; Chandra *et al.*, 2000; Limon-Pacheco *et Gonsebatt*, 2009).

El daño celular asociado al estrés oxidativo no tiene que ver sólo con la concentración de ROS, sino con el tipo concreto de ROS y su capacidad reactiva. La vida media y reactividad de estas especies es muy diferente, lo cual da idea de los posibles procesos biológicos en los que podrían estar implicadas (Droge, 2002). La formación de $O_2^{\cdot-}$, generado cuando el O_2 se reduce tras la adquisición de un único electrón, puede ser considerado el paso inicial para la formación de otras ROS, y RNS. Como indicaremos más adelante, diferentes sistemas enzimáticos pueden dar lugar a la aparición de este reactivo anión.

Las fuentes principales generadoras de ROS en las células son los complejos I, III y IV de la cadena transportadora de electrones mitocondrial (NADH-ubiquinona oxidoreductasa, ubiquinona reducida-citocromo c reductasa, y citocromo c oxidasa, respectivamente), y el complejo enzimático de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH oxidasa), hallado en la membrana plasmática (**Fig. 13**). Todos estos sistemas, han sido descritos en las células β pancreáticas.

El $O_2^{\cdot-}$ y el H_2O_2 son producidos de forma habitual durante el metabolismo aerobio por los complejos I, III y IV de la cadena transportadora de electrones presentes en la membrana mitocondrial interna (Vinogradov *et Grivennikova*, 2015; Banh *et al.*, 2016). Las ROS producidas en estos complejos se generan cuando los electrones unidos a sus transportadores redox se derivan hacia el oxígeno circundante y no a

aquellos que normalmente deberían aceptarlos, lo que daría lugar inicialmente a $O_2^{\cdot-}$. Se ha estimado que el 1-5% del oxígeno total consumido por la mitocondria no se reduce enteramente a agua, sino que es transformado en $O_2^{\cdot-}$, el cual, de manera espontánea como consecuencia de la acción de la enzima superóxido dismutasa, es convertido a su vez en H_2O_2 . En la membrana mitocondrial externa, además, existe otra fuente adicional de ROS que proviene de la desaminación de aminas biógenas por monoaminoxidasas, las cuales, a través de una reducción dielectrónica, producen H_2O_2 a partir de $O_2^{\cdot-}$ (Quinlan *et al.*, 2012; Quinlan *et al.*, 2013).

La producción de ROS por las mitocondrias puede conducir a daño oxidativo en las proteínas mitocondriales, las membranas y el DNA, perjudicando la capacidad de las mitocondrias para sintetizar ATP y llevar a cabo su amplia gama de funciones metabólicas, incluyendo el ciclo del ácido tricarbóxico, oxidación de ácidos grasos, el metabolismo de los aminoácidos, la síntesis del hemo y el ensamblaje del centro FeS que son fundamentales para el funcionamiento normal de la mayoría de las células. El daño oxidativo mitocondrial también puede aumentar la tendencia de las mitocondrias a liberar proteínas del espacio intermembrana tales como el citocromo c (cyt c) al citosol mediante la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP) y activar así la maquinaria apoptótica de la célula. Además, la producción de ROS mitocondrial conduce a la inducción del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTP), que hace que la membrana interna sea permeable a moléculas pequeñas en situaciones como isquemia/ lesión por reperfusión. En consecuencia, no sorprende que el daño oxidativo mitocondrial contribuya a una amplia gama de patologías. Además, las ROS mitocondriales pueden actuar como una señal redox modulable, afectando de manera reversible a la actividad de una serie de funciones en la mitocondria, el citosol y el núcleo (Murphy, 2009).

La NADPH oxidasa está constituida por un complejo conjunto de subunidades que normalmente, se encuentran físicamente separadas en diferentes compartimentos de la célula. Así, mientras algunos de sus componentes se hallan en el citosol ($p40^{phox}$, $p47^{phox}$, $p67^{phox}$ y la proteína pequeña Rho Rac) otros, permanecen anclados a la membrana plasmática ($gp91^{phox}$, NOX2 y $p22^{phox}$). En presencia de un estímulo, las subunidades citosólicas migran hacia la membrana plasmática y se ensamblan junto al resto de las subunidades dando lugar al complejo enzimático catalíticamente activo. Como resultado de la acción catalítica del complejo se transfieren electrones desde el NADPH al oxígeno molecular generándose $O_2^{\cdot-}$ (Valle *et al.*, 2011).

La NADPH oxidasa fue descrita por primera vez en fagocitos donde está implicada en

la eliminación de patógenos, aunque se encuentra presente también en otros numerosos tipos celulares, incluyendo a las células β . La actividad NADPH oxidasa está relacionada con la disfunción de la célula β como lo demuestran estudios realizados en islotes pancreáticos procedentes de modelos animales de diabetes tipo 2 y humanos, donde la expresión y la actividad de este enzima se ve alterada. Así, se ha publicado que en ratas OLETF, (Otsuka Long Evans Tokushima Fatty) y en ratones *db/db*, los componentes catalíticos de este complejo enzimático se encuentran sobreexpresados (Nakayama *et al.*, 2005). De igual forma, un estudio realizado con islotes humanos aislados de pacientes con diabetes tipo 2 mostró que los niveles de RNAm que codifican a la subunidades catalíticas del complejo NADPH oxidasa se encontraban claramente incrementados (Marchetti *et al.*, 1998).

Numerosos estudios coinciden en afirmar que el estrés oxidativo celular es un componente importantísimo en la generación del daño celular y tisular asociado a procesos patológicos tales como la inflamación, la formación de tumores, la degeneración relacionada con la edad, enfermedades como la diabetes tipo 2, etc. (Evans *et al.*, 2002; Brownlee, 2005; Greeman *et al.*, 2007; Newsholme *et al.*, 2007; Keane *et al.*, 2015). Este daño celular y tisular puede producirse muy especialmente, como se ha comentado, cuando la actividad neutralizante de los sistemas tamponadores redox y los sistemas antioxidantes celulares, como las enzimas catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión reductasa (GSH_{red}) ó glutatión peroxidasa (GSH_{per}) no son suficientes para controlar el exceso de especies reactivas producidas.

Niveles elevados de glucosa y/o lípidos circulantes; esto es, concentraciones glucotóxicas, glucolipotóxicas o lipotóxicas, asociadas a la diabetes tipo 2 inducen estrés oxidativo en diferentes tipos celulares, incluyendo a los islotes pancreáticos (Newsholme *et al.*, 2007; Keane *et al.*, 2015; Janikiewicz *et al.*, 2015). De hecho, se ha postulado que el estrés oxidativo en la célula β , producto del desbalance entre el incremento en la generación de ROS mitocondrial por exceso de glucosa y las actividades de las defensas antioxidantes, juega un importante papel en la patogénesis de la diabetes tipo 2 (Robertson, 2004). En este contexto, es de destacar que la célula β posee un sistema de defensa anti-oxidante débil y una baja capacidad para tamponar el exceso de ROS. Así, por ejemplo, los niveles de SODs citosólicos y mitocondriales son un 30-50% inferiores a los hallados en tejidos como hígado, y los de GSH_{per} y CAT alcanzan sólo el 1% de los encontrados en este tejido. Todo ello, conduce a afirmar que las células β poseen una delicada homeostasis redox, muy susceptible de ser desequilibrada, y así, también, una gran susceptibilidad al daño

oxidativo (Robertson *et al.*, 1992; Newsholme *et al.*, 2007; Gehrman *et al.*, 2010; Newsholme *et al.*, 2012).

El porqué de esta baja capacidad anti-oxidante de la célula β parece tener relación con el papel que juegan las ROS en la regulación de la GSIS y otros procesos fisiológicos asociados a la misma. Así, diferentes aproximaciones experimentales han demostrado que ROS como H_2O_2 y $O_2^{\cdot -}$ facilitan la secreción de insulina. En esta misma línea, se ha observado también que los anti-oxidantes disminuyen la GSIS (Pi *et al.*, 2010). A pesar de ser baja su capacidad anti-oxidante, los islotes pancreáticos poseen un sistema de defensa frente al exceso de ROS activo, del que son responsables enzimas como peroxidasa, glutarredoxina y la tiorredoxina (Ivarsson *et al.*, 2005) y un sistema tamponador redox constituido, principalmente, por el glutatión, molécula que está presente a concentraciones mM, y que se mantiene en estado reducido (GSH) por la glutatión reductasa. El GSH transfiere sus equivalentes de reducción al ascorbato y las glutarredoxinas. Junto a éstos, la vitamina E y el ácido úrico también juegan un papel como tamponadores redox.

Desde el punto de vista metodológico, es conveniente tener en cuenta que la medida de la producción de ROS en los islotes pancreáticos tras GSIS parece variar según el tipo de sonda que se use y de las condiciones particulares de depleción de glucosa de los islotes empleados. Así se han hallado, disminuciones en el estrés oxidativo al incrementar la glucosa en GSIS, con la sonda fluorescente dihidroetidio en células β primarias de rata (Martens *et al.*, 2005) ó con la sonda fluorescente dihidro diclorofluoresceína (DCF) (Lacraz *et al.*, 2009). Sin embargo, habría que resaltar que otros laboratorios han encontrado resultados opuestos; esto es, incrementos en ROS tras GSIS (Bindokas *et al.*, 2003; Sakai *et al.*, 2003; Leloup *et al.*, 2009).

Independientemente de la metodología utilizada, sería lógico pensar que los diferentes escenarios de estrés oxidativo podrían contribuir de forma diferente al daño causado a las células β . Así, en condiciones de bajo estrés oxidativo (sin citotoxicidad), las células β activarían adecuadamente las respuestas adaptativas para mantener al mínimo el daño oxidativo celular y el relacionado con el impedimento de la GSIS. En estas condiciones, no sería esperable detectar cambios en las concentraciones de ROS durante su medida. Sin embargo, en condiciones de estrés oxidativo medio, podría producirse una inducción persistente de los anti-oxidantes endógenos que llevaría a atenuar la señalización por ROS dependiente de glucosa, reduciendo así la GSIS. En estas condiciones, se podrían detectar disminuciones en las concentraciones de ROS debida a la rápida actividad de las defensas anti-oxidantes.

Estudios recientes han encontrado una acusada disminución de ROS inducida por glucosa que se ha relacionado con el incremento en la actividad de la ruta de las pentosas fosfato y la secreción de insulina (Lanzen, 2008). Una ruta de las pentosas fosfato más activa conduce a generar gran cantidad de poder reductor en forma de NADPH, lo que estimularía la síntesis de glutatión reducido (GSH), y de esta forma, también, la actividad de enzimas antioxidantes que disminuyen ROS (Rebelato *et al.*, 2011; Newsholme *et al.*, 2012). Ante situaciones de elevado estrés oxidativo, no obstante, los sistemas anti-oxidantes serían insuficientes, lo que causaría la muerte celular, hecho que haría que la GSIS no tuviese lugar. Un notable nivel de ROS sería medido, lógicamente, en estas condiciones.

Extrapolando a los diferentes estadios de la diabetes tipo 2, en estadios tempranos predominarían los fenómenos de alteraciones en la GSIS debidas a activación del sistema de defensa anti-oxidante, mientras que en estadios más tardíos de la enfermedad predominarían las alteraciones en la GSIS debida a muerte celular (Pi *et al.*, 2010). Por tanto, la detección de incrementos o disminuciones en la producción de ROS en islotes pancreáticos aislados podría estar relacionada con el estado de la diabetes en curso.

La generación excesiva de ROS por parte de la mitocondria no compensados por las defensas anti-oxidantes lleva a la disfunción mitocondrial, peroxidación lipídica, estrés del retículo y respuesta inflamatoria. Todos estos procesos tienen lugar no sólo en tejidos periféricos, sino también en células β pancreáticas, contribuyendo a la patogénesis de la diabetes (Ježek *et al.*, 2012). En relación al daño mitocondrial, la principal diana del estrés oxidativo es el DNA mitocondrial, sus proteínas de mantenimiento y las proteínas de la maquinaria de transcripción y replicación del DNA mitocondrial. A nivel citosólico, el estrés oxidativo produce acumulación de proteínas, lípidos y DNA oxidados. Asimismo, se activan ciertos segundos mensajeros sensibles a ROS, como p38MAPK (Purves *et al.*, 2001) y JNK/SAPK (Kaneto *et al.*, 2005). La activación de la vía JNK durante el estrés oxidativo da lugar a una menor expresión del gen de la insulina por alteración de la regulación epigenética del factor de transcripción PDX1 (Boucher *et al.*, 2006). Este factor, juega un papel clave en la proliferación y supervivencia de las células β , de lo que se deduce que estos importantes procesos son también modulados por el estrés oxidativo.

Detrás de la disfunción de la célula β y la apoptosis mediada por citoquinas están también vías de señalización intracelular que están inducidas por ROS. Así, la producción de ROS debida a citoquinas induce la expresión de iNOS, produciendo la

liberación de NO[•] y la translocación al núcleo de NFκB (Liu *et al.*, 2014). Así, NFκB induce la expresión de NADPH oxidasa lo que convierte a esta enzima en la fuente principal de ROS citosólico.

Otro estudio, realizado con islotes humanos aislados de pacientes afectados de diabetes tipo 2, mostró un incremento en los niveles de RNAm de la subunidad catalítica de la NADPH oxidasa (Marchetti *et al.*, 1998). Por el contrario, islotes pancreáticos de ratas sometidas a una dieta alta en grasa mostraron una reducción en la expresión de la NADPH oxidasa (Valle *et al.*, 2011). Como fue comentado anteriormente, esta reducción de expresión del enzima, podría constituir una respuesta adaptativa de la célula β válida en los estadios tempranos de la enfermedad para contrarrestar los altos niveles de ROS ocasionados por una dieta alta en grasa. Si bien, sería posible prever, no obstante, que un consumo muy prolongado de esta dieta, haría que la respuesta adaptativa de reducción de NADPH oxidasa fuese insuficiente para controlar el nivel de ROS, lo que se reflejaría en la alteración de la secreción de insulina y en la puesta en marcha de procesos de daño y muerte celular. Otros autores han descrito, también, que tanto las ROS generadas a través de la NADPH oxidasa en la célula β en el citosol, como aquellas que lo hacen en la mitocondria, regulan la secreción de insulina y la integridad celular (Uchizono *et al.*, 2006; Imoto *et al.*, 2008). Todo ello, lleva a formular la hipótesis de que el diseño y uso de inhibidores específicos del enzima NADPH oxidasa podría ser de utilidad para disminuir ROS y RNS, y que ello, podría constituir una nueva estrategia terapéutica para el tratamiento de la diabetes tipo 2.

Dados los beneficios de los anti-oxidantes a la hora de contrarrestar el estrés oxidativo, así como sus inconvenientes al disminuir la GSIS, es interesante valorar si las terapias con anti-oxidantes podrían ser una buena opción terapéutica para combatir la diabetes tipo 2 o no. Los estudios reportados hasta la fecha arrojan resultados contradictorios. Pese a que existen un buen número de estudios que demuestran que compuestos anti-oxidantes protegen la célula β del estrés oxidativo, tanto en líneas celulares β como en islotes aislados de roedores y de humanos (Hussain, 2007; Kaneto *et al.*, 1999; Lortz *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2002; Yamamoto *et al.*, 2008), los resultados de la terapia con anti-oxidantes en humanos son poco concluyentes (Wiernsperger, 2003; Scott *et al.*, 2004). Se han encontrado niveles elevados de moléculas anti-oxidantes en ratones diabéticos *ob/ob* (Nakao *et al.*, 2000), en sujetos en riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 (Costa *et al.*, 2002) y en pacientes diabéticos (Chen *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004). Estos niveles elevados de anti-oxidantes podrían tener relación con la respuesta adaptativa comentada

anteriormente; sin embargo, en roedores, se ha observado que la sobre-expresión de enzimas como la CAT y la Gpx1 incrementa la probabilidad de desarrollar diabetes (McClung *et al.*, 2004). Más aún, ha sido publicado que el uso de anti-oxidantes en humanos incrementa la incidencia de muerte por cualquier causa (Bjelakovic *et al.*, 2007). El análisis de la información recogida en los artículos anteriormente reseñados llevaría a poner en duda la validez del uso de los anti-oxidantes como fármacos para el tratamiento de la diabetes tipo 2. Algunos autores, de hecho, proponen que estas sustancias no deberían ser utilizados con fines preventivos para esta enfermedad, ya que podrían interferir con la señalización redox en estadios donde todavía no existe un estrés oxidativo considerado patológico (Ježek *et al.*, 2012). El interés sobre anti-oxidantes se está centrando también en la búsqueda de moléculas que no tengan capacidad para penetrar en la célula, y por ello, que puedan ayudar a combatir el daño oxidativo extracelular sin interferir con la señalización intracelular mediada por ROS (Pi *et al.*, 2010).

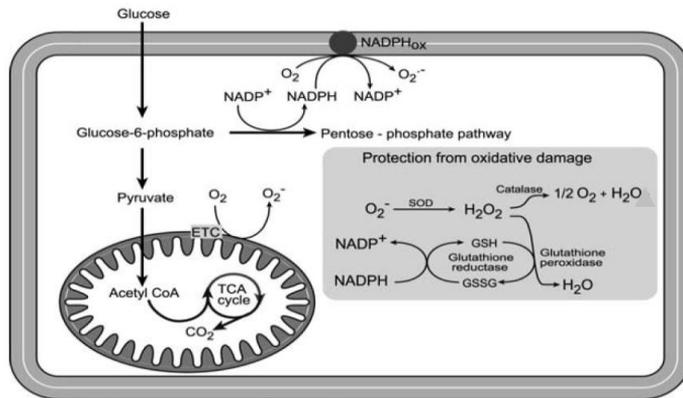


Figura 13. Producción de ROS en una célula β a partir de la actividad mitocondrial de la NADH ubiquinona oxidoreductasa, ubiquinol-citocromo-c reductasa y citocromo c oxidasa (complejos I, III y IV de la cadena transportadora de electrones respectivamente) y del complejo NADPH oxidasa localizado en la membrana plasmática. También se representan los sistemas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa, la glutatión reductasa y la glutatión peroxidasa. (Newsholme *et al.*, 2007).

1.8 APOPTOSIS Y REGULACIÓN DE LA MASA DE CÉLULAS β EN EL ISLOTE PANCREÁTICO EN LA DIABETES

La apoptosis o muerte celular programada es un mecanismo fisiológico, crucial para el mantenimiento de la homeostasis tisular. En el hombre, alrededor de

diez billones de células, continuamente, ponen en marcha mecanismos apoptóticos para mantener la tasa de regeneración tisular. La muerte celular programada por apoptosis se desencadena también en respuesta a daños irreparables en el DNA, el ataque por agentes infecciosos, etc. (Kono *et al.*, 2008). Durante la apoptosis, el núcleo celular se condensa hasta que se fragmenta, perdiéndose la integridad funcional de las membranas nuclear y plasmática de la célula. Al final del proceso, se originan los llamados cuerpos apoptóticos, que son fagocitados por los macrófagos, eliminándose así la célula sin dejar rastro alguno. Las características morfológicas de la apoptosis son la vacuolización de la membrana, la fragmentación nuclear y la condensación de la cromatina (Vives-Pi *et al.*, 2015). Se han descrito dos vías principales para el desencadenamiento del proceso apoptótico, la intrínseca, dependiente de la salida del citocromo c desde el espacio intermembrana mitocondrial hacia el citosol, y la extrínseca, dependiente de la presencia de los llamados receptores y ligandos de muerte. Ambas vías se desencadenan con la activación de proteínas llamadas caspasas.

La apoptosis es un proceso finamente regulado que cuando se altera produce graves patologías como malformaciones, defectos en el desarrollo, enfermedades autoinmunes, enfermedades neurodegenerativas o la aparición de tumores. La regulación de la masa de células β pancreáticas se mantiene en los islotes a través de un fino balance entre la tasa de replicación y la apoptosis de este tipo celular, ya que la tasa de neogénesis en el páncreas adulto humano se considera insignificante comparada con la de roedores (Finegood *et al.*, 1995; Bonner-Weir, 2000).

En la diabetes tipo 2, la masa de células β de los islotes pancreáticos está disminuida y la principal causa que parece conducir a ello es el exceso en los niveles de apoptosis. Prevenir el proceso apoptótico podría ser, por tanto, muy beneficioso para el tratamiento de esta enfermedad (Butler *et al.*, 2003; Bouwens *et al.*, 2005; Oh, 2015). Algunos de los factores y mecanismos que se han propuestos que pueden favorecer la apoptosis en la diabetes tipo 2 se resumen a continuación:

- La hiperglucemia prolongada parece tener un efecto pro-apoptótico, relacionado con fenómenos de glucotoxicidad que conducen a la disfunción de la célula β . En estas circunstancias se genera estrés oxidativo y se ponen en marcha rutas de señalización pro-apoptóticas de respuesta al estrés en retículo endoplásmico lo que provocan apoptosis (Wali *et al.*, 2014; Del Guerra *et al.*, 2005).

- Se ha propuesto también que el acúmulo de depósitos de oligómeros del polipéptido amiloide (IAPP, *islet amyloid polypeptide*) produce citotoxicidad asociada a la puesta en marcha de mecanismos apoptóticos en las células β (Janson *et al.*, 1999).
- Se ha descrito en modelos animales, que el factor de transcripción *Pdx1* (*pancreatic duodenal homeobox 1*), es un factor regulador clave para la expansión en masa de las células β en situaciones de resistencia a la insulina. Así, cuando la producción de *Pdx1* es insuficiente, se produce apoptosis y se dificulta el proceso adaptativo de expansión en masa de los islotes anteriormente comentado (Kulkarni *et al.*, 2004).
- En modelos de ratones transgénicos, se ha comprobado que el oncogén *c-myc*, juega un papel muy importante en los procesos de diferenciación y crecimiento de las células β . De tal forma, que su sobre-expresión conduce a un excesivo estímulo del ciclo celular, lo que desencadena mecanismos que conducen a muerte por apoptosis de estas células (Laybutt *et al.*, 2002).
- Se ha descrito también que los aumentos en las concentraciones plasmáticas de glucosa observados en la diabetes tipo 2 producen aumentos de citoquinas pro-inflamatorias como la interleuquina 1 (IL-1 β), seguidos de la activación del factor nuclear κ B (NF- κ B) y apoptosis mediada a través de receptores de muerte FAS (*tumor necrosis factor receptor superfamily member 6*) (Maedler *et al.*, 2002).
- Asimismo se ha descrito que la exposición crónica de la células β a ácidos grasos desencadenan la síntesis de ceramidas y activación de rutas de respuesta al estrés del retículo endoplásmico y estrés oxidativo que incrementan los niveles de apoptosis (Biden *et al.*, 2014).

En conclusión, la tasa de apoptosis está incrementada en la diabetes tipo 2 y este proceso limita los fenómenos adaptativos de expansión en masa de las células β en los islotes pancreáticos. Entre los mecanismos implicados, parecen jugar un papel relevante fenómenos glucotóxicos y lipotoxicidad, acúmulo de oligómeros amiloides y de factores inflamatorios, los cuáles conducen a estrés oxidativo general y respuestas pro-apoptóticas por parte del retículo endoplásmico y de receptores de muerte. Asimismo, y como se indicó anteriormente, intervenir farmacológicamente sobre procesos que desencadenan la apoptosis de los islotes pancreáticos podría tener gran utilidad en la terapia de la diabetes tipo 2.

1.9 EL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE Y EL SISTEMA LPI-GPR55

1.9.1 Breve descripción general

El sistema endocannabinoide (SEC) es un sistema de comunicación intercelular que regula numerosos procesos homeostáticos, entre ellos, el balance energético y el metabolismo lipídico y glucídico (Osei-Hyiaman *et al.*, 2005; Pagotto *et al.*, 2006; Cota, 2007; Di Marzo, 2009; De Petrocelis *et Di Marzo*, 2009; Gatta-Cherifi *et Cota*, 2015; Gruden *et al.*, 2015). El SEC está formado por tres tipos de componentes moleculares; los receptores cannabinoides (receptor cannabinoide CB1 (CB1) y receptor cannabinoide CB2 (CB2)), los ligandos cannabinoides (los llamados “endocannabinoides”) de naturaleza lipídica, siendo los más conocidos la anandamida (AEA) y el 2-araquidonil-glicerol (2-AG) y las enzimas de síntesis y degradación de los mismos (**Fig. 14**).

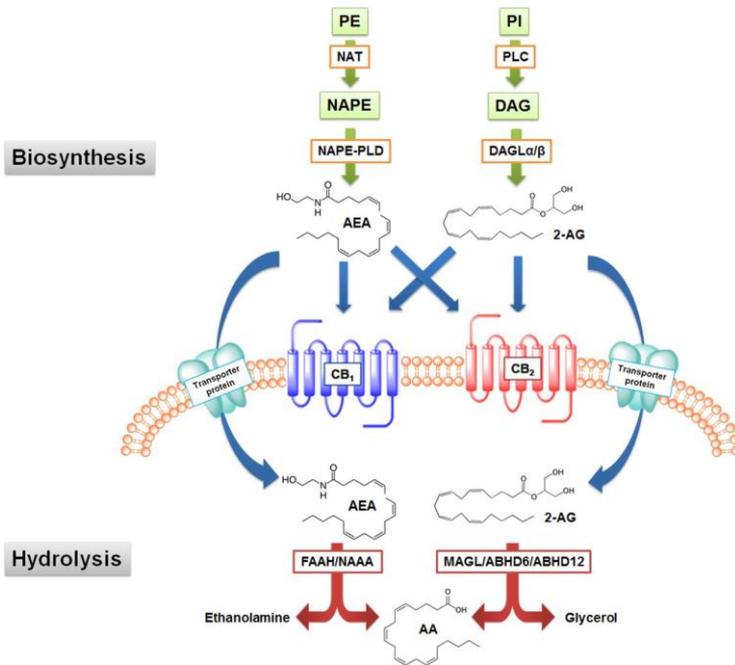


Figura 14. Componentes del sistema endocannabinoide. El SEC está compuesto por los receptores cannabinoides (CB1 y CB2), los endocannabinoides (AEA y 2-AG) y las enzimas de síntesis (PLD y DAGL) y degradación de los mismos (FAAH y MAGL). (Lee *et al.*, 2016).

Los dos subtipos de receptores cannabinoides pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G de siete dominios transmembrana y en concreto a los de la clase A o tipo rodopsina (Devane *et al.*, 1992; Munro *et al.*, 1993; Howlett *et al.*, 2002; Thompson *et al.*, 2014; Romero-Zerbo *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2014; Vemuri *et*

Makriyannis, 2015). Los receptores CB1 son ubicuos, expresándose densamente en áreas del cerebro que regulan el apetito y la saciedad, la temperatura corporal, la locomoción y el humor (Bisogno *et al.*, 1999; Bellocchio *et al.*, 2006; Pagotto *et al.*, 2006; Bifulco *et al.*, 2007; Di Marzo *et al.*, 2009). Estos receptores también han sido identificados en tejidos periféricos como el hígado, músculo esquelético, tracto intestinal, tejido adiposo y páncreas endocrino (Osei-Hyiaman *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005; Massa *et al.*, 2005; Juan-Picó *et al.*, 2006; Cota, 2007; Bermúdez-Silva *et al.*, 2007; De Petrocellis *et al.*, 2007; Bermúdez-Silva *et al.*, 2008; Nakata *et al.*, 2008; Starowicz *et al.*, 2008; Tharp *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011). Por su parte, los receptores CB2, están localizados principalmente en células del sistema inmune, tales como macrófagos, linfocitos B y células NK, aunque también han sido identificados en el sistema nervioso central (Van *et al.*, 2005), en otras regiones cerebrales (Skaper *et al.*, 1996; Nuñez *et al.*, 2004), y en el pulmón, bazo, hígado, tejido adiposo, músculo esquelético y páncreas endocrino (Howlett *et al.*, 2002; Mallat *et al.*, 2006; Juan-Picó *et al.*, 2006; Cavuoto *et al.*, 2007; Bermúdez-Silva *et al.*, 2008; Nakata *et al.*, 2008; Starowicz *et al.*, 2008; Tharp *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011).

La N-araquidoniletanolamida (AEA) o anandamida es un lípido bioactivo derivado del ácido araquidónico. Este endocannabinoide se sintetiza por la hidrólisis catalizada por la enzima fosfolipasa C (PLD) del fosfolípido de membrana N-araquidoniletanolamida (NAPE) que libera AEA y ácido fosfatídico. La síntesis es dependiente de Ca^{2+} . La degradación de este endocannabinoide es llevada a cabo por la amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH), que libera ácido araquidónico (AA) y etanolamina. La enzima FAAH también cataliza el proceso inverso transformando el AA + etanolamina en AEA. La FAAH ha sido purificada, clonada y secuenciada (Cravatt *et al.*, 1996).

Por otro lado, el 2-AG se sintetiza, de un modo similar a la AEA, a partir del diacilglicerol (DAG). La enzima que facilita este proceso se llama diacilglicerol lipasa (DAGL), existiendo dos isoformas, la α y la β (Bisogno *et al.*, 2003). A su vez, el 2-AG es degradado por la monoacilglicerol lipasa (MAGL), la FAAH y varias enzimas todavía no caracterizadas. Se cree que la MAGL es responsable de este proceso de degradación hasta en un 85%.

Respecto al receptor GPR55, es conveniente hacer notar que algunos investigadores lo consideran parte del sistema endocannabinoide, mientras que otros no. Hay bastante controversia al respecto, y pese a ser considerado en un principio como el receptor cannabinoide CB3 por algunos autores, en la actualidad se tiende a pensar lo

contrario. Existen multitud de razones de peso para ello, por ejemplo, que su homología con CB1 y CB2 es de tan solo el 14% aproximadamente (Baker *et al.*, 2006), careciendo además del típico sitio de unión cannabinoide (Kotsikorou *et al.*, 2011). Por otro lado, GPR55 no pertenece a la misma subfamilia de receptores acoplados a proteína G que CB1 y CB2. GPR55 se encuadra en el grupo δ de la clase A mientras que CB1 y CB2 están en el grupo α . Esto sugiere que si GPR55 es fisiológicamente activado por endocannabinoides, han debido adquirir esta propiedad de manera evolutivamente independiente a CB1 y CB2 (Pertwee *et al.*, 2010). Pese a ser sensible a cannabinoides, hecho éste que llevó a su consideración inicial como receptor cannabinoide, parece que el ligando endógeno del receptor GPR55 es el lisofosfolípido 1- α -lisofosfatidilinositol (LPI), (Oka *et al.*, 2007). Posteriormente ha sido descubierto que otro compuesto relacionado, el 2-Araquidonil-LPI, activa GPR55 de manera más potente que el LPI, por lo que podría ser éste el verdadero ligando endógeno de GPR55 (Oka *et al.*, 2009).

Por todo ello, con el estado actual de conocimiento, parece más adecuado considerar al sistema LPI-GPR55 como un sistema de señalización independiente, con conexiones moleculares con el sistema endocannabinoide. Como se describe más abajo, aparte de participar en procesos como el metabolismo óseo, el dolor inflamatorio o la modulación del sistema inmune, GPR55 parece desempeñar también un papel importante en los tejidos metabólicamente relevantes en general, y en el páncreas endocrino en particular.

1.9.2 Estudio del receptor cannabinoide CB1; herramientas farmacológicas

Como se ha comentado anteriormente, los receptores CB1 son uno de los efectores de la señalización por endocannabinoides, probablemente son los más estudiados. Se encuentran ampliamente expresados en el sistema nervioso central, de hecho, de entre los receptores acoplados a proteína G, se consideran los mayoritariamente expresados en este tejido. Se expresan también aunque en menor medida, en tejidos periféricos. De interés para nuestro estudio, CB1 se expresa en todos los tejidos que son relevantes desde el punto de vista metabólico, como el hígado, el tejido adiposo, el músculo y el páncreas endocrino.

Los receptores CB1, al igual que los CB2 están acoplados a proteínas $G_{i/o}$ (inhibitorias) heterotriméricas (**Fig. 15**), que promueven la inhibición de la adenilato ciclasa y la

activación de canales de K^+ , así como proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK) (Howlett *et al.*, 1990; Demut *et Molleman*, 2006; Fonseca *et al.*, 2013) y la vía de las quinasas PI3K/PDK/PKB (Gómez del Pulgar *et al.*, 2000; Blázquez *et al.*, 2015). Además, el receptor CB1 está acoplado, a través del dímero $\beta\gamma$ de $G_{i/o}$ a otros efectores, como son los canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje y canales de K^+ . La activación de los receptores cannabinoides parece disminuir la concentración intracelular de Ca^{2+} a través del cierre de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje en células neuronales (Mackie *et Hille*, 1992); aunque contradictoriamente, se ha argumentado también que los cannabinoides podrían inducir elevaciones transitorias del Ca^{2+} intracelular tras su estimulación (Sugiura *et al.*, 1996).

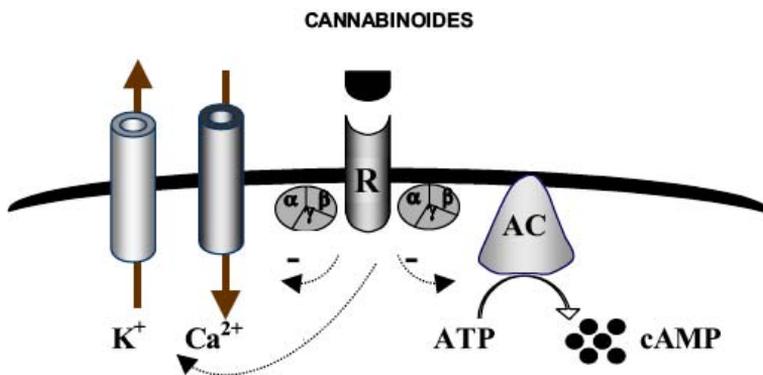


Figura 15. Acoplamiento de receptores cannabinoides a proteínas G inhibitorias. La activación de receptores cannabinoides a través de sus agonistas (cannabinoides) induce la estimulación de proteínas $G_{i/o}$ heterotriméricas (inhibitorias), que activan canales de K^+ e inhiben canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y a la enzima adenilato ciclasa (AC). La modulación de esta vía intracelular afecta a la expresión de numerosos genes. Childers *et Deadwyler*, 1996.

Existe un amplio arsenal farmacológico para estudiar la actividad mediada por los receptores cannabinoides, principalmente agonistas y antagonistas de estos receptores. En este trabajo hemos utilizado varias de estas moléculas, las cuáles, serán descritas a continuación:

A) Rimonabant

El rimonabant o SR141716A, fue el primer antagonista descrito como molécula que bloqueaba selectivamente los receptores CB1 tanto *in vitro* como *in vivo* (Rinaldi-Carmona *et al.*, 1994; Pertwee, 1997; Sun *et al.*, 2012) (**Fig. 16 A**). Su nombre químico es N-piperino-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metilpirazol-3-carboxamida. Esta molécula también ha mostrado cierta capacidad farmacológica para actuar como

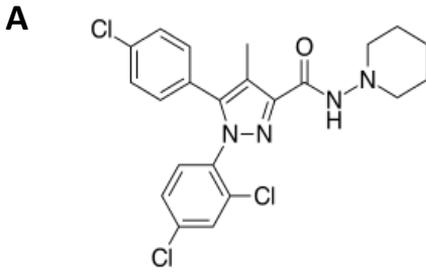
agonista inverso (Pertwee, 2001). Como se comentará más adelante, esta molécula, patentada por la farmacéutica francesa Sanofi-Aventis, fue usada clínicamente en países europeos y no europeos hasta un total de 56, como fármaco anti-obesidad, dado los buenos resultados obtenidos en los primeros ensayos clínicos que se llevaron a cabo. En ellos se demostró que el rimonabant reducía el apetito, la grasa abdominal y los factores de riesgo cardio-metabólicos en pacientes obesos y con riesgo de desarrollar diabetes (Després *et al.*, 2005; Van Gaal, 2005; Pi-Sunyer *et al.*, 2006; Scheen *et al.*, 2006). Sin embargo, tras poco más de dos años de comercialización fue retirado del mercado al detectarse que causaba importantes efectos adversos centrales (Bermúdez-Silva *et al.*, 2010).

B) LH-21

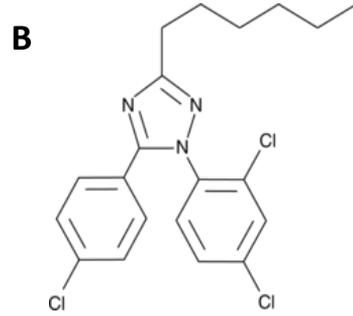
El LH-21 es un compuesto derivado del 1,2,4 triazol, en concreto 5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-3-hexil-1H-1,2,4-triazol (**Fig. 16 B**). Ha sido identificado como un antagonista neutro del receptor CB1 en experimentos *in vitro* e *in vivo*, teniendo una baja capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica. Se ha descrito, que LH-21 inhibe la ingesta y la ganancia de peso en ratas Zucker obesas sin desencadenar ningún tipo de trastorno de estrés y ansiedad en estos animales (Pavón *et al.*, 2006). Por ello, ha sido propuesto como un antagonista periférico de CB1; el cual, mantiene las propiedades anti-obesidad de rimonabant pero carece de efectos adversos de naturaleza central (Pavón *et al.*, 2006; Pavón *et al.*, 2008; Alonso *et al.*, 2012; Alvarado *et al.*, 2013). A pesar de lo comentado, en otros estudios realizados con roedores, LH-21 no redujo el consumo de alimentos en un modo CB1-dependiente y, además, manifestó capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica (Chen *et al.*, 2008).

C) ACEA

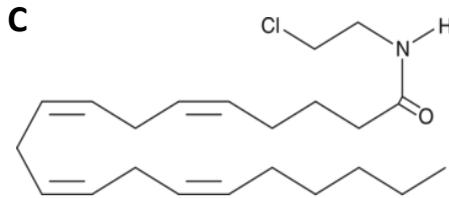
La ACEA, araquidonil-2-cloroetilamida, (**Fig. 16 C**) es un análogo sintético del ligando endógeno cannabinoide AEA con una alta selectividad por CB1 sobre CB2 y con una afinidad por CB1 en el rango nanomolar (Hillard *et al.*, 1999). Actúa como un agonista de CB1, inhibiendo la acumulación de cAMP inducida por forskolina *in vitro* e incrementando la unión de [^{35}S]GTPgammaS en membranas cerebelares.



Rimonabant (SR141716A) N-piperino-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metilpirazol-3-carboxamida
 $C_{22}H_{21}Cl_3N_4O$



LH-21 5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-3-hexil-1H-1,2,4-triazol
 $C_{20}H_{20}Cl_3N_3$



ACEA N-(2-cloroetil)-5Z,8Z,11Z,14Z-eiscosatetraenamida
 $C_{22}H_{36}ClNO$

Figura 16. Estructuras químicas de antagonistas y agonistas sintéticos del receptor cannabinoide CB1. (A) Rimonabant y (B) LH-21, antagonistas de CB1 y (C) ACEA, agonista de CB1.

1.9.3 Estudio del receptor GPR55; herramientas farmacológicas

El descubrimiento de acciones no dependientes de CB1 ni CB2 por parte de determinados cannabinoides ha llevado a proponer la existencia de otros receptores cannabinoides distintos a éstos (Howlet *et al.*, 2002). De hecho, el descubrimiento en la literatura de patentes de la unión de algunos cannabinoides a GPR55 llevó inicialmente a presentar a este receptor como un nuevo receptor cannabinoide que mediaría estas acciones independientes de CB1 y CB2 (Baker *et al.*, 2006). Sin embargo, como se ha comentado en el apartado 1.9.1, existen toda una serie de

descubrimientos posteriores que apuntan a que GPR55 no es un receptor cannabinoide, sino más bien un receptor para otros lípidos bioactivos (LPI y 2-Araquidonil-LPI) con sensibilidad a cannabinoides, o sea, cuya actividad puede ser modulada por cannabinoides mediante unión alostérica (Nevalainen *et al.*, 2010). Desde su clonación e identificación como un nuevo receptor acoplado a proteína G en 1999, son muchos los estudios de expresión tisular de GPR55 que han sido llevados a cabo. Así, GPR55 se expresa ampliamente en cerebro humano (Sawzdargo *et al.*, 1999). Se han detectado RNAs mensajeros que codifican para GPR55 en varias regiones del cerebro y de la médula espinal. Estas zonas incluyen el hipocampo, núcleo caudado y putamen (Sawzdargo *et al.*, 1999), tronco del encéfalo, cerebelo, corteza frontal, hipotálamo, cuerpo estriado (Ryberg *et al.*, 2007) y neuronas del ganglio de la raíz dorsal (Lauckner *et al.*, 2008). Curiosamente, en el cuerpo estriado, hipotálamo y tronco del encéfalo de ratones, los niveles de RNAm que codifican para GPR55 son similares a los de CB1, sugiriendo un papel importante de GPR55 en estas regiones (Ryberg *et al.*, 2007; Henstridge *et al.*, 2011). De acuerdo con esto último, se ha publicado que GPR55 podría jugar un papel muy importante en la coordinación motora (Wu *et al.*, 2013).

Además de en el cerebro, GPR55 también se expresa en tejidos periféricos de humanos, ratones y ratas como el bazo, glándulas suprarrenales y hueso (Sawzdargo *et al.*, 1999; Ryberg *et al.*, 2007; Whyte *et al.*, 2009), así como en tejidos metabólicamente relevantes como el tejido adiposo (Moreno-Navarrete *et al.*, 2012), el tracto gastrointestinal (Ryberg *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2011; Schicho *et al.*, 2011), el hígado (Sawzdargo *et al.*, 1999; Romero-Zerbo *et al.*, 2011; Moreno-Navarrete *et al.*, 2012), músculo esquelético (Simcocks *et al.*, 2014) e islotes pancreáticos (Romero-Zerbo *et al.*, 2011; McKillop *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014), tejido objeto de nuestro estudio.

Respecto a la sensibilidad a cannabinoides de GPR55, se han identificado un amplio número de ligandos cannabinoides que interaccionan con este receptor (Pertwee *et al.*, 2010). Aunque existen trabajos que sugieren que los endocannabinoides como la AEA y el 2-AG son agonistas de GPR55, correlacionándose en algunos casos con incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ (Rybert *et al.*, 2007; Lauckner *et al.*, 2008; Waldeck-Weiermair *et al.*, 2008; Henstridge *et al.*, 2009), no existen evidencias suficientes para considerar a GPR55 como un receptor de AEA ni de 2-AG (Pertwee *et al.*, 2010). Con respecto a otros cannabinoides sintéticos como rimonabant, CP55940 y AM251 se han obtenido resultados contradictorios, considerándose una acción agonista en

algunos trabajos (Kapur *et al.*, 2009) y antagonista en otros. Probablemente, esto refleja una baja actividad intrínseca como agonistas (agonistas parciales) (Pertwee *et al.*, 2010). Además, se requieren mayores concentraciones de estos ligandos para activar a GPR55 que para bloquear a CB1 (Pertwee, 2005; Ryberg *et al.*, 2007), si bien es posible que rimonabant pueda alcanzar suficientes concentraciones cuando es administrado *in vivo* para inhibir a CB1 y activar a GPR55. De hecho, la activación de GPR55 por rimonabant, puede ser la causante de los efectos terapéuticos asociados a la obesidad (Kapur *et al.*, 2009; Yin *et al.*, 2009; Henstridge *et al.*, 2010).

El cannabidiol (CBD) parece ser un antagonista de GPR55 como han apoyado numerosos trabajos (Ryberg *et al.*, 2007; Lauckner *et al.*, 2008; Whyte *et al.*, 2009). Otros ligandos sintéticos, análogos al CBD como el O-1602 y el Abnormal cannabidiol (Abn-CBD) son considerados agonistas de GPR55 (Johns *et al.*, 2007; Ryberg *et al.*, 2007; Waldeck-Weiermair *et al.*, 2008; Romero-Zerbo *et al.*, 2011; Godlewski *et al.*, 2009; Whyte *et al.*, 2009; Mckillop *et al.*, 2013). Sin embargo, hay estudios que sugieren que el cannabinoide sintético O-1602 actúa a través de un mecanismo independiente de GPR55 (Oka *et al.*, 2007; Shair *et al.*, 2010; Díaz-Arteaga *et al.*, 2012). Incluso el receptor GPR18 ha sido propuesto como una diana alternativa para O-1602 (McHugh *et al.*, 2010). El CBD puede unirse además a receptores vaniloides de tipo 2 (TRPV2) (Qin *et al.*, 2008), receptores de serotonina 5-HT_{1A} (Campos *et al.*, 2008; De Petrocellis *et al.*, 2008; Resstel *et al.*, 2009) y receptores gamma activados por el factor de proliferador de peroxisomas (PPAR γ), (O'Sullivan *et al.*, 2009).

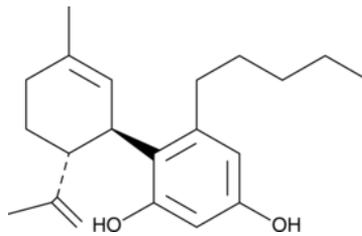
En lo que parece existir más consenso es en que GPR55 es un receptor de LPI endógeno, y posiblemente también de 2-Araquidonil-LPI (Oka *et al.*, 2007; Oka *et al.*, 2009).

Respecto a la señalización intracelular, GPR55 es un GPCR asociado a subunidades de proteínas $G\alpha_{13}$ (Ryberg *et al.*, 2007; Henstridge *et al.*, 2009; Lauckner *et al.*, 2008; Whyte *et al.*, 2009; Obara *et al.*, 2011) y $G\alpha_q$ (Lauckner *et al.*, 2008). Experimentos realizados en líneas celulares y cultivos primarios han mostrado que la activación farmacológica de GPR55 por agonistas cannabinoides y derivados de fosfolípidos indujeron elevaciones en las $[Ca^{2+}]_i$ (Oka *et al.*, 2007; Waldeck-Weiermair *et al.*, 2008; Henstridge *et al.*, 2010; Pineiro *et al.*, 2011; Kargl *et al.*, 2013; Sylantsev *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2013), y estas respuestas eran consecuencia de la liberación del Ca^{2+} del retículo endoplásmico seguido de la activación de la fosfolipasa C (PLC) y la generación de inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) (Lauckner *et al.*, 2008; Waldeck-Weiermair

et al., 2008). Ambas subunidades G_q y $G\alpha_{13}$ estaban implicadas en la activación de la PLC mediada por GPR55 (Lauckner *et al.*, 2008). Las proteínas pequeñas Rho GTPasas, incluidas RhoA, Cdc42 and Rac1, son otra clase de segundos mensajeros que son considerados ser activados por GPR55 vía $G\alpha_{13}$ (Ryberg *et al.*, 2007; Whyte *et al.*, 2009; Obara *et al.*, 2011), pudiendo incrementar los niveles intracelulares de Ca^{2+} y desencadenando la remodelación de los filamentos de actina (Lauckner *et al.*, 2008). Como se ha comentado previamente, no existen muchas moléculas de síntesis que estén claramente consideradas agonistas o antagonistas específicos de GPR55. En este trabajo hemos utilizado la molécula que actualmente es considerada más específica de GPR55, como es el Abn-CBD, la cual se describe a continuación:

A) Abn-CBD

El Abnormal cannabidiol (Abn-CBD), 4-[3-metil-6R-(-1-metiletényl)-2-ciclohexen-1-yl]-5-pentil-1,3-benzenediol (**Fig. 17**), es un análogo sintético del cannabidiol. Abn-CBD, es un cannabinoide atípico pues no muestra afinidad por los receptores cannabinoideos CB1 y CB2. Sin embargo, está considerado un potente agonista selectivo del receptor GPR55 (Godlewski *et al.*, 2009; McKillop *et al.*, 2013), aunque también parece tener afinidad por el receptor GPR18 según experimentos recientes de medida de Ca^{2+} intracelular en la línea celular HEK293 que expresan GPR18 (Console-Bram *et al.*, 2014) y en neuronas de ratas (Lu *et al.*, 2013). En islotes pancreáticos se ha observado que Abn-CBD incrementa la secreción de insulina, $[Ca^{2+}]_i$ y AMP_c en células BRIN-BD11 y en islotes aislados de ratones a baja (5.6mM) y alta (16.7mM) glucosa. La medida de AMP_c se realizó a 11mM glucosa. Además, estos efectos estimulatorios observados eran dependientes de GPR55 porque al inhibir este receptor con cannabidiol, disminuyeron los niveles de insulina. Abn-CBD también disminuyó los niveles plasmáticos de glucosa y aumentó los niveles circulantes de insulina en estudios de ratones Swiss (McKillop *et al.*, 2013). Por tanto, parece un compuesto adecuado para activar de manera específica a GPR55 en los islotes pancreáticos.



Abn-CBD 4-[3-metil-6R-(1-metiletenyl)-
2-ciclohexen-1-yl]-5-pentil-1,3-benzenediol
 $C_{21}H_{30}O_2$

Figura 17. Estructura química del agonista sintético del receptor GPR55, Abn-CBD.

1.9.4 El receptor CB1 en la fisiología del páncreas endocrino

Dado el papel del páncreas endocrino y del sistema endocannabinoide en la homeostasis energética, la implicación de este sistema de señalización en la regulación de la secreción de insulina ha sido estudiada en los últimos años. En la actualidad, la literatura disponible sobre la expresión y función de los receptores cannabinoide en los islotes de Langerhans es confusa y, a menudo, contradictoria. No hay un consenso sobre la distribución de estos receptores en los islotes pancreáticos o el tipo de relación (directa o indirecta) con la secreción de insulina. Esto puede deberse en parte a diferencias inter-especie en la distribución pancreática de estos receptores (Bermúdez-Silva *et al.*, 2009). Sin embargo, sí parece establecido, dado los numerosos estudios publicados procedentes de diferentes laboratorios, que los receptores CB1 se expresan en islotes pancreáticos teniendo capacidad para modular la secreción de insulina (Juan-Picó *et al.*, 2006; Matias *et al.*, 2006; De Petrocellis *et al.*, 2007; Bermúdez-Silva *et al.*, 2008; Nakata *et al.*, 2008; Starowicz *et al.*, 2008; Tharp *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012; Persaud *et al.*, 2012). La mayoría de ellos coinciden en que la activación o inhibición de los receptores cannabinoide en la célula β provoca cambios en el flujo de Ca^{2+} intracelular afectando a la secreción de insulina estimulada por glucosa. En concreto, la activación de CB1 parece incrementar la secreción de insulina tanto en islotes de roedores como en humanos (Matias *et al.*, 2006; Bermúdez-Silva *et al.*, 2008), mientras que su bloqueo específico disminuye la secreción de insulina (Getty-Kaushik *et al.*, 2009; Bermúdez-Silva *et al.*, 2015). Asimismo, la activación de CB1 también

estimula la secreción de glucagón y somatostatina en islotes humanos (Bermúdez-Silva *et al.*, 2008).

Hasta el momento existe muy poca información en la literatura científica respecto a los posibles mecanismos mediante los cuales los receptores cannabinoides pueden modular la secreción de insulina. De ahí que parte de los objetivos de esta tesis estén relacionados con la señalización intracelular *downstream* a los receptores CB1. Sin embargo, un reciente trabajo apunta a que la activación de los receptores CB1 puede reclutar Akt y ERK1/2 para activar FAK y promover la formación de placas de adhesión focal que permitirían la liberación de las vesículas de insulina correspondiente al segundo pool secretorio (Malenczyk *et al.*, 2013). Por otro lado, estudios muy recientes de nuestro grupo, que acaban de ser publicados (Bermúdez-Silva *et al.*, 2016), indican que la modulación de la secreción de insulina ejercida por CB1 requiere de una vía mTORC1 funcional, lo que aclara un poco más y da nuevas pistas sobre los mecanismos y procesos de la célula β en los que los receptores CB1 están implicados. También se ha demostrado que la activación de CB1 inhibe la señalización a través del receptor de insulina en las células β (Kim *et al.*, 2011), en lo que sería un mecanismo modulador de la actividad de la vía IR/IRS2/Akt, la cual favorece la supervivencia y proliferación en la célula β . Es destacable indicar que Akt promueve la activación de mTORC1 mediante la inhibición del complejo inhibitorio de mTORC1 TSC1/2 (Cota, 2009). De este modo, la activación de CB1 favorecería los procesos de muerte celular mientras que su bloqueo promovería la supervivencia y proliferación (Kim *et al.*, 2012). Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que el receptor CB1 de las células β está relacionado tanto con el proceso secretorio de insulina como con la supervivencia y muerte celular a través de la señalización autocrina del receptor de insulina y del reclutamiento de las vías Akt/mTORC1.

Sin embargo, no existe información sobre el posible papel del CB1 pancreático en la producción de ROS, moléculas muy importantes en los procesos de muerte celular y que también podrían jugar un importante papel en los mecanismos de señalización implicados en la secreción de insulina, como se ha comentado anteriormente. Interesantemente, se ha descrito recientemente la expresión y la funcionalidad de CB1 en la membrana de la mitocondria, un orgánulo clave en la generación de ROS (Bénard *et al.*, 2012). Asimismo, el receptor CB1 ha sido relacionado con la producción de ROS en otros tipos celulares, como las neuronas, donde se ha visto que la activación de CB1 disminuye la producción de ROS (Ma *et al.*, 2015; Palomba *et al.*,

2015). Por todo lo comentado, investigar la producción de ROS mediada por CB1 en islotes pancreáticos constituye otro de los objetivos de la presente tesis doctoral.

Finalmente, para ilustrar el extenso papel que juega CB1 en el islote pancreático, es de destacar un reciente artículo en el que se demuestra que CB1 participa durante el desarrollo embrionario en la organización de la microarquitectura del islote, contribuyendo a establecer su tamaño y la proporción de células β con respecto a las α (Malenczyk *et al.*, 2015).

1.9.5 El receptor GPR55 en la fisiología del páncreas endocrino

Respecto al papel fisiológico de GPR55 en el páncreas endocrino, es conveniente empezar diciendo que mucho antes de la primera descripción de GPR55 en los islotes (Romero-Zerbo *et al.*, 2011) y del descubrimiento de este receptor como diana del LPI (Oka *et al.*, 2007) ya había sido descrita la capacidad del LPI para modificar los flujos de Ca^{2+} y la secreción de insulina en islotes de rata (Metz, 1988). La expresión de GPR55 ha sido identificada a nivel de RNAm y proteína en líneas celulares β de rata y ratón (BRIN-BD11 y MIN6 respectivamente) y en islotes de rata, ratón y humanos (Romero-Zerbo *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011; McKillop *et al.*, 2013). Resultados de inmunohistoquímica indican que GPR55 se expresa en células β de islotes de ratón y de rata, sugiriendo que podría tener un papel fisiológico en el control de la secreción de insulina. De hecho, nuestro grupo de investigación describió que el O-1602, un agonista de GPR55, potencia la secreción de insulina estimulada por glucosa en islotes de rata y ratón. Este efecto era anulado en ratones KO de GPR55, lo que sugiere que es específico de GPR55 (Romero-Zerbo *et al.*, 2011). Posteriormente, otros autores demostraron que otros agonistas de GPR55 (AM251, O-1602, Abn-CBD y las aciletanolamidas OEA y PEA) estimulan la secreción de insulina en islotes de ratón y células BRIN-BD11, siendo el Abn-CBD el ligando que mostraba una acción más específica sobre GPR55. Los efectos causados por agonistas de GPR55 sobre la secreción de insulina fueron inhibidos en diferente medida por CBD (McKillop *et al.*, 2013).

En cuanto a los mecanismos que median las acciones de GPR55 en los islotes pancreáticos, se sabe que las elevaciones en $[\text{Ca}^{2+}]_i$ son importantes en la transducción de los efectos estimulatorios de los agonistas de GPR55. O-1602 provocó elevaciones transitorias de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en islotes de rata (Romero-Zerbo *et al.*, 2011); AM251, O-1602, Abn-CBD, OEA y PEA causaron también rápidos incrementos en el

flujo de Ca^{2+} en líneas celulares MIN6 y BRIN-BD11 (Ning *et al.*, 2008; McKillop *et al.*, 2013). Se ha encontrado también activación de la fosfolipasa C (PLC) mediada por GPR55 en células β (Liu *et al.*, 2014). Los agonistas de GPR55 anteriormente comentados, también estimularon pequeños incrementos en los niveles intracelulares de AMP_c en células BRIN-BD11 (Ning *et al.*, 2008; McKillop *et al.*, 2013), que deben ser secundarios a la activación de isoformas de la enzima adenilato ciclasa sensible a Ca^{2+} , ya que no hay evidencias de que GPR55 esté directamente acoplado a Gs y promueva la acumulación de AMP_c (Liu *et al.*, 2014). La activación de PLC mediada por GPR55 puede ocurrir por la vía clásica $\text{G}\alpha_q$ aunque también por $\text{G}\alpha_{13}$, como sugiere el trabajo de Liu y colaboradores (Liu *et al.*, 2014), ya que esta subunidad ha sido identificada en islotes (Skoglund *et al.*, 1999; Hammar *et al.*, 2009).

En base a todos estos datos, se podría pensar que LPI, actuando sobre GPR55, podría promover la secreción de insulina en islotes pancreáticos. Este hecho, no ha podido aún ser validado con claridad, ya que se han descrito efectos estimuladores de la secreción de insulina también en islotes pancreáticos de ratones C57BL/6J GPR55^{-/-} tratados con LPI (Liu *et al.*, 2014). No obstante, estudios *in vivo* han confirmado que la administración a corto plazo de agonistas de GPR55 en ratas y ratones incrementan los niveles plasmáticos de insulina y mejoran la tolerancia a la glucosa (Romero-Zerbo *et al.*, 2011; McKillop *et al.*, 2013), habiéndose comprobado en algunos casos, la especificidad de estos efectos, en animales carentes del receptor GPR55 (Romero-Zerbo *et al.*, 2011). En conjunto, estos hallazgos sugieren que, tras una administración aguda, tanto el LPI como otros agonistas de GPR55 promueven la secreción de insulina, mejorando la respuesta a la glucosa de los islotes.

No obstante, los efectos a largo plazo del LPI y de otros agonistas de GPR55 sobre la función pancreática y la homeostasis de la glucosa no han sido aún estudiados y son, en este momento, difíciles de predecir dado que la activación de GPR55 ha sido relacionada con hiperfagia y obesidad, como se verá más adelante en el apartado 1.10.3.

También hay evidencias de que GPR55 puede tener un papel en la supervivencia de la célula β ya que islotes de ratones GPR55^{-/-} mostraron ser significativamente más susceptibles a la apoptosis que los islotes de ratones WT (Liu *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014). Estos resultados están en consonancia con datos publicados donde se muestra que el O-1602 promovió fosforilación de ERK1/2 y CREB en varios tipos celulares (Whyte *et al.*, 2009; Henstridge *et al.*, 2010; Andradás *et al.*, 2011; Pineiro *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2014).

En conjunto, todos estos datos sugieren que el receptor GPR55 tiene un papel en la función y supervivencia de la célula β pancreática, aunque es necesario disponer de ligandos más específicos, de estudios sobre otros posibles ligandos endógenos (como el araquidonil-LPI), y de tratamientos a más largo plazo y en modelos de obesidad/diabetes para desvelar su relevancia real.

1.10 CB1 Y GPR55 COMO DIANAS PARA TRATAR LA DIABETES TIPO 2

1.10.1 El receptor CB1 central *versus* el receptor CB1 periférico

A principios del presente siglo se descubrió que el receptor CB1 juega un importante papel en la modulación del metabolismo. Así, se describieron efectos beneficiosos del bloqueo de CB1 en modelos animales de obesidad, tanto mediante aproximaciones genéticas como farmacológicas, como disminución del apetito, inducción de pérdida de peso y mejora en parámetros metabólicos (Colombo *et al.*, 1998; Berry *et al.* Mechoulam, 2002; Solinas *et al.* Goldberg, 2005; Ravinet Trillou *et al.*, 2003). Estos efectos sugerían que la manipulación farmacológica del sistema endocannabinoide podría ser una estrategia terapéutica apropiada para combatir la obesidad. Además, se encontraron niveles elevados de endocannabinoides en obesidad, sugiriendo la existencia de una sobreactivación de este sistema. En base a estos resultados experimentales, se llevaron a cabo cuatro ensayos clínicos en pacientes obesos humanos para probar la eficacia de rimonabant (un antagonista/agonista inverso de CB1) para combatir la obesidad y los desórdenes metabólicos: RIO-(Rimonabant in Obesity)-Europe (Van Gaal *et al.*, 2005), RIO-Lipids (Després *et al.*, 2005), RIO-North America (Pi-Sunyer *et al.*, 2006), y RIO-Diabetes (Scheen *et al.*, 2006). La administración de rimonabant redujo el peso de los sujetos (aunque recuperaron el peso tras la interrupción del tratamiento), incrementó los niveles de las lipoproteínas de alta densidad del colesterol (HDL), disminuyó la concentración de triglicéridos, los niveles plasmáticos de glucosa, insulina y leptina e incrementó los niveles plasmáticos de adiponectina. Estos resultados condujeron a que, el 21 de junio de 2006, la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) aprobara la prescripción de rimonabant (bajo el nombre comercial de Acomplia) en la Unión Europea. El tratamiento estaba indicado, en combinación con una dieta baja en calorías y actividad física para pacientes obesos o con sobrepeso (con un índice de masa corporal (IMC) superior a 27kg/m^2), y con factores de riesgo asociados tales como dislipemias o diabetes tipo 2. De esta forma, el rimonabant fue comercializado en Europa y en otros países como Argentina, Brasil, Suiza y Reino Unido.

Sin embargo, la administración de drogas y medicamentos (FDA) de los EEUU nunca llegó a aprobar su comercialización. El 13 de junio de 2007 la FDA votó en contra de aprobar el rimonabant porque el 26% de los sujetos tratados en los ensayos clínicos sufrieron depresión, irritabilidad, agitación, ansiedad, insomnio, dolor de cabeza y otros efectos adversos psiquiátricos en comparación con el 14% de individuos con los mismos síntomas del grupo placebo. La razón fisiológica que propuso la FDA para explicar estos efectos adversos ocasionados por el tratamiento con rimonabant fue que el sistema endocannabinoide, además, desempeña un papel de autoprotección, modulando respuestas fisiológicas frente a condiciones estresantes reincidentes en condiciones patológicas, tales como ansiedad, fobias, depresión, y estrés postraumático. De esta manera, el rimonabant podría inhibir otras rutas de señalización del sistema endocannabinoide implicadas en mecanismos de recompensa, contribuyendo a la aparición de desórdenes en el estado de ánimo y depresión. La FDA estimó que el 30% de los pacientes obesos recibían antidepresivos. Un año después de la comercialización en Europa de rimonabant, se notificó la existencia de efectos adversos en sujetos que recibieron el tratamiento (7 sujetos con ataques epilépticos, 26 con ideas suicidas o de autolesión, y un suicidio). Por ello, el 19 de julio de 2007 la EMEA modificó la prescripción de rimonabant, argumentando que los pacientes con antecedentes psiquiátricos no deberían recibir este fármaco. Así, aquellos individuos con antecedentes de desórdenes psiquiátricos o que requerían tratamiento antidepresivo fueron excluidos de las indicaciones del fármaco. Finalmente, al año siguiente la EMEA recomendó la retirada de rimonabant del mercado, después de registrarse 5 casos de suicidio asociados al tratamiento en un periodo de tres meses en 2008. Tras esto, las empresas Sanofi-Aventis, Merck, Pfizer y Solvay anunciaron el cese en sus investigaciones clínicas relacionadas con este tipo de compuestos. La EMEA retiró oficialmente del mercado el rimonabant el 16 de enero de 2009 (Bermúdez-Silva *et al.*, 2010).

Pese a esto, los beneficios metabólicos de rimonabant eran evidentes. El tratamiento crónico con rimonabant no sólo redujo la ganancia de peso, sino que además, mejoró significativamente el perfil lipídico (disminuyendo los niveles de triglicéridos, y colesterol) y la tolerancia a la glucosa en los humanos obesos y en roedores (Bensaid *et al.*, 2003; Scheen *et al.*, 2006). Además, también disminuyó la aterosclerosis coronaria arterial (Nissen *et al.*, 2008), mejorando el control glucémico (Rosenstock *et al.*, 2008) y reduciendo la acumulación de la grasa intra-abdominal y la grasa presente en el hígado (Després *et al.*, 2009) y además, disminuyó un 0.51% la hemoglobina glucosilada (HbA1c) respecto al grupo placebo.

Interesantemente, otros estudios han demostrado que la activación de los receptores cannabinoides CB1 en los tejidos periféricos promueve la lipogénesis, acumulación de lípidos en el tejido adiposo, secreción de insulina y modulación de los niveles de adiponectina (Cota *et al.*, 2003; Osei-Hyiaman *et al.*, 2005; Bermúdez-Silva *et al.*, 2008). Estos datos confirman un papel crucial de los receptores periféricos CB1 en la modulación del metabolismo (Bermúdez-Silva *et al.*, 2010). En modelos animales de obesidad, el bloqueo a nivel central de los receptores CB1 parece tener un efecto crucial sobre la disminución del apetito y del peso corporal exclusivamente, mientras que no parece tener efectos beneficiosos sobre el metabolismo lipídico y glucídico, requiriéndose para ello la inhibición periférica de estos receptores (Nogueiras *et al.*, 2008). De este modo, si la acción periférica de los receptores cannabinoides CB1 contribuye a los efectos beneficiosos metabólicos del bloqueo de CB1, limitando el acceso de los antagonistas de CB1 al cerebro, podrían mantenerse sus efectos terapéuticos reduciendo o eliminando los efectos adversos psiquiátricos.

En este sentido, el bloqueo periférico de los receptores cannabinoides CB1 en tejidos metabólicamente activos tiene los siguientes efectos beneficiosos: en el hígado, disminuye la lipogénesis, aumenta la oxidación de ácidos grasos y la producción de glucosa; en el páncreas, modifica los niveles de insulina aunque los autores no han llegado a un consenso si aumentan o disminuyen los niveles de esta hormona; en el músculo esquelético, aumenta la sensibilidad a la insulina; en el tejido adiposo, disminuye la lipogénesis, aumenta la oxidación de los ácidos grasos, promueve la biogénesis mitocondrial y transdiferenciación, aumenta los niveles de adiponectina y mejora la sensibilidad a la insulina, y finalmente, en la sangre, aumenta el ratio del colesterol HDL/LDL, disminuye los niveles de triglicéridos y los niveles de glucosa e insulina (Kunos *et al.*, 2008; Kunos *et al.*, 2011).

Por todo esto, recientemente se han ido desarrollado antagonistas periféricos del receptor CB1, a partir de modificaciones en la estructura del rimonabant, con baja o nula penetrancia a la barrera hematoencefálica (reduciendo los efectos adversos asociados), algunos de ellos con actividad de antagonista neutro, evitando así la acción farmacológica característica de los agonistas inversos, que se caracterizan por tener un efecto fisiológico opuesto al agonista, más allá del bloqueo del receptor. Ejemplos de compuestos que reúnen tales características y se relacionan con efectos metabólicos beneficiosos en modelos animales son el AM6545, que mejoró el riesgo cardiometabólico en modelos de ratones obesos, mejorando la homeostasis de la glucosa y reduciendo los depósitos de grasa en el hígado y el perfil lipídico plasmático (Tam *et al.*, 2010); el triazol LH-21, un antagonista neutro del receptor cannabinoide

CB1, ya introducido anteriormente, con pobre penetrancia en el sistema nervioso central, que disminuye el apetito y potencia las acciones anorexigénicas de la oleil-etanolamida (OEA), (un lípido supresor del apetito) en ratas Zucker (Pavón *et al.*, 2008); JD5037, que también mejoró el riesgo cardiometabólico pero, además, redujo la obesidad revirtiendo la resistencia a la leptina en ratones obesos por el consumo de una dieta alta en grasa (DIO) (Tam *et al.*, 2012). Otros estudios han comparado la farmacocinética y farmacodinámica de compuestos antagonistas del receptor CB1 de acción periférica como TM38837 con rimonabant, en ensayos con humanos, obteniéndose menos efectos adversos con este nuevo compuesto pero con la misma potencia en la acción farmacológica que el rimonabant (Klumpers *et al.*, 2013).

En resumen, el bloqueo de los receptores cannabinoideos se ha demostrado como una estrategia farmacológica adecuada para combatir la obesidad y las enfermedades asociadas. Sin embargo, después del fracaso del fármaco rimonabant debido a los efectos adversos de naturaleza central, el interés de la industria farmacéutica está centrado en el desarrollo de antagonistas que no atraviesen la barrera hematoencefálica, puesto que la acción periférica de los mismos parece suficiente para mejorar la obesidad y los parámetros bioquímicos. En la actualidad, se están realizando ensayos clínicos con antagonistas periféricos así como se siguen buscando nuevas moléculas capaces de modular, ya sea de manera alostérica u ortostérica este receptor a nivel periférico.

1.10.2 El receptor CB1 pancreático en la fisiopatología de la diabetes tipo 2

Se ha podido comprobar que existe una desregulación del SEC en el páncreas de animales sometidos a una dieta alta en grasa, encontrándose niveles elevados de endocannabinoides en este tejido (Matias *et al.*, 2006; Starowsky *et al.*, 2008). Este elevado tono endocannabinoide eleva la concentración de insulina plasmática, y con ello, acrecienta los efectos hiperglucémicos causados por la resistencia periférica a la insulina (Di Marzo, 2008).

De acuerdo a esto, se ha observado que el bloqueo de los receptores CB1 con rimonabant en islotes aislados de ratas Zucker obesas y diabéticas disminuye la secreción basal de insulina (Getty-Kaushik *et al.*, 2009). Asimismo, el mencionado bloqueo de CB1, previene la hiperinsulinemia y protege de la pérdida de masa de células β en ratas diabéticas tratadas crónicamente (Duvivier *et al.*, 2009).

En otro estudio, ratas Wistar con obesidad inducida por la dieta, fueron tratadas con un extracto orgánico de cannabis, observándose una disminución del peso de los animales y una protección de las células β de los efectos negativos causados por la obesidad (Levendal *et al.*, 2012). Aunque no es posible determinar a ciencia cierta qué componentes del extracto fueron los responsables de los efectos comentados, los altos niveles de CB1 en estos animales sugieren que se produjo un bloqueo de la señalización a través de este receptor (Levendal *et al.*, 2012).

No está del todo claro, no obstante, si los efectos protectores causados en los islotes están relacionados de manera directa con los receptores CB1, como sugieren algunos autores (Rohrbach *et al.*, 2012; Coskun *et al.*, 2014) o son consecuencia de la reducción de peso provocada por rimonabant, como sugiere otro estudio (Jin *et al.*, 2013). No obstante, los estudios que apoyan un papel directo de los receptores CB1 del islote parecen más consistentes y más completos.

Es de resaltar, también, el importante papel que juegan los macrófagos que infiltran a los islotes pancreáticos en la diabetes. La acción de los endocannabinoides sobre los receptores CB1 expresados en los macrófagos parece tener gran importancia en los fenómenos inflamatorios que conducen al fallo de la célula β durante la diabetes tipo 2 (Jourdan *et al.*, 2013).

En conjunto, todos estos resultados sugieren un importante papel de los receptores CB1 pancreáticos en procesos fisiopatológicos de la diabetes tipo 2, como la hiperinsulinemia, el estrés oxidativo y la apoptosis de las células β .

1.10.3 Los receptores GPR55 pancreáticos en la fisiopatología de la diabetes tipo 2

El posible papel de los receptores GPR55 en los cambios fisiopatológicos que tienen lugar durante la diabetes tipo 2, así como la posible utilidad terapéutica de actuar sobre estos receptores para mejorar la condición diabética son, a día de hoy, desconocidos. Lamentablemente, no existen estudios que investiguen posibles cambios en la expresión o señalización a través de este receptor en modelos animales de diabetes o en pacientes diabéticos, ni ninguno que vincule este receptor con procesos fisiopatológicos del islote pancreático como la hiperinsulinemia, la inflamación intra-islote, el estrés oxidativo o la apoptosis de la masa de células β . Sin embargo, es de destacar que, debido a la capacidad de determinados ligandos

cannabinoides, como rimonabant, para activar GPR55, es posible que parte de los efectos beneficiosos asignados a CB1 estén en realidad mediados por GPR55, o al menos exista una contribución parcial a dichos efectos. Además, el papel que juega este receptor, en la función y supervivencia de la célula β pancreática en condiciones fisiológicas normales sugiere que podría tener también un papel destacado en la fisiopatología de la diabetes tipo 2 (Simcocks *et al.*, 2014). Es preciso resaltar que GPR55 ha sido implicado en la modulación de procesos inflamatorios (Balenga *et al.*, 2011; Henstringe *et al.*, 2009) lo que hace pensar que la intervención farmacológica sobre el mismo, podría ayudar a combatir la inflamación de bajo grado asociada a la obesidad y la diabetes. Sin duda, se han de llevar a cabo más estudios para clarificar esta hipótesis.

Por el contrario, sí parece más establecido el papel de GPR55 en la obesidad, una condición patológica que antecede y que es un importante factor de riesgo para la diabetes tipo 2.

Así, estudios recientes han mostrado que el agonista de GPR55 O-1602, tanto en administración aguda como subcrónica, induce en ratas hiperfagia y adiposidad, respectivamente. Estos efectos se produjeron también en animales GPR55^{-/-}, lo que sugiere que eran independiente de GPR55 (Díaz-Arteaga *et al.*, 2012).

Sin embargo, en otro estudio realizado por el mismo grupo se detectaron cambios de la expresión de GPR55 en el tejido adiposo y en los niveles plasmáticos del ligando endógeno LPI en respuesta a desafíos que modifican el estado energético como el ayuno y la gonadectomía (Imbernon *et al.*, 2014).

También se ha encontrado que los niveles de LPI en sangre de pacientes obesos y la expresión de GPR55 en tejido adiposo visceral se correlacionan positivamente con el peso corporal, el BMI y el porcentaje de grasa (Moreno-Navarrete *et al.*, 2012). Además, el LPI *in vitro* era capaz de inducir la expresión de genes lipogénicos en explantes de tejido adiposo visceral humano (Moreno-Navarrete *et al.*, 2012). Desafortunadamente, no hay hasta la fecha estudios que relacionen al otro posible ligando endógeno del GPR55, el araquidonil-LPI, con la homeostasis energética o la fisiología de los islotes pancreáticos.

Resaltando el papel importante de GPR55 en el control de la ingesta, se ha descrito en un estudio realizado con mujeres japonesas que la presencia de un polimorfismo de

un sólo nucleótido (SNP) en el gen de GPR55 aumenta la vulnerabilidad para padecer anorexia (Ishiguro *et al.*, 2011).

En conjunto, todos estos datos parecen avalar que GPR55 podría tener un importante papel en obesidad, lo que sugiere que también pudiera tenerlo en la diabetes tipo 2. No obstante queda aún por ser clarificado el papel que este receptor tiene en los islotes en relación a fenómenos como la hiperinsulinemia, la inflamación intra-islote, el estrés oxidativo o la apoptosis; todos ellos, procesos relacionados con el fracaso de la célula β en la diabetes.

II. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO Y OBJETIVOS





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

A continuación se resumen un conjunto de ideas fundamentales, ya expuestas en la introducción, que servirán de justificación para la formulación de los objetivos de esta tesis doctoral.

La secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS) en las células β pancreáticas está modulada por múltiples factores, como nutrientes, incretinas y otras sustancias entre las que se encuentran los endocannabinoides. La red intracelular de señalización que regula la GSIS es, por tanto, extraordinariamente compleja y multifactorial. En la diabetes tipo 2 estas vías de señalización están alteradas, lo que se refleja en pérdidas de la masa de las células β y en alteraciones en la producción de insulina. Los cannabinoides ejercen sus funciones reguladoras de GSIS actuando, principalmente, sobre receptores CB1 y receptores relacionados como GPR55. Son conocidos los efectos beneficiosos de la intervención farmacológica sobre estos receptores, pero la información que se encuentra en la literatura científica en relación a su expresión y función moduladora de GSIS es confusa y en algunos casos contradictoria. Poco se conoce también, muy especialmente, sobre los efectos modulares que ejercen sobre rutas de señalización como las de AKT, AMPK o el factor de transcripción CREB que controlan la proliferación, supervivencia y masa de las células β , tanto en situaciones normales como en la diabetes tipo 2. Se han realizado estudios en tejidos diferentes al páncreas endocrino, que relacionan a los receptores CB1 con la supervivencia y muerte celular a través del reclutamiento de las vías Akt/mTOR pero se desconoce si ambas vías de señalización convergen en los islotes pancreáticos. En este contexto, nuestro grupo de investigación ha sido el primero en establecer, recientemente, una conexión funcional entre los receptores CB1 y la vía de señalización mTORC1 en las células β pancreáticas. No existe tampoco información en la bibliografía sobre los efectos que los receptores CB1 puedan tener sobre la modulación de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), aspecto muy importante relacionado con el daño que sufren los islotes pancreáticos durante la diabetes tipo 2. Una situación similar se da con los receptores GPR55 en relación a la supervivencia celular, ya que este receptor ha sido relacionado con procesos proliferativos y apoptóticos en otros tejidos. Finalmente indicar que, aunque algunos antagonistas de CB1 han sido descritos como agonistas de GPR55, estos efectos no están aún bien establecidos y su estudio merece mayor atención.

De acuerdo con estas ideas generales, en esta tesis doctoral se proponen los siguientes objetivos:

OBJETIVOS

1. Analizar, en islotes pancreáticos de ratones pre-diabéticos y sanos, y en islotes humanos, la modulación que ejercen los receptores CB1 y GPR55 sobre las rutas de señalización intracelular AKT, AMPK y el factor de transcripción CREB, implicadas en el control de la proliferación, crecimiento en masa y estatus energético de las células β pancreáticas.
2. Estudiar la modulación que sobre la secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS) y el Ca^{2+} intracelular ejercen los receptores CB1 y GPR55 pancreáticos, tras tratar *in vitro* islotes de ratones sanos y GPR55^{-/-}, e islotes de humanos sanos, con antagonistas de CB1 o agonistas de GPR55.
3. Analizar cómo el antagonismo de CB1 afecta a la señalización a través de la vía mTOR en islotes pancreáticos de ratones sanos y pre-diabéticos y el efecto que ello tiene sobre la GSIS.
4. Estudiar los efectos moduladores que la inhibición o activación del receptor CB1 ejerce sobre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), en islotes pancreáticos de rata y en islotes de ratones sanos y pre-diabéticos.
5. Averiguar el papel que el receptor GPR55 juega en los mecanismos de supervivencia y susceptibilidad a la apoptosis de los islotes pancreáticos, tratando *in vitro* islotes de ratones sanos y GPR55^{-/-}, así como de humanos, con ligandos cannabinoides.

III. MATERIALES Y MÉTODOS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

3.1 ANIMALES

Durante la realización de esta tesis doctoral, hemos trabajado con distintos modelos animales. Así, hemos empleado ratones de la cepa C57BL/6J (machos) de entre 10 y 12 semanas de edad, adquiridos de Janvier (Janvier SAS, Le Genest-Saint-Isle, AQ15 France), que han sido utilizados para obtener un modelo animal de obesidad y pre-diabetes (véase el apartado 3.3). También se han usado ratones carentes del receptor GPR55 (*knockout (KO)* de GPR55 ó GPR55^{-/-}) así como ratones WT (GPR55^{+/+}) de la misma cepa (C57BL/6J), amablemente cedidos por la Dra. Shanta J. Persaud (King's College, Londres) y procedentes del laboratorio del Dr. David Baker (Blizard Institute, Barts and The London School of Medicine and Dentistry, Londres) (Sisay *et al.*, 2013). Para los experimentos de secreción estática y dinámica de insulina estimulada por glucosa, se han utilizado también ratones de las cepas ICR y CD-1, machos, de 8 a 10 semanas de edad, adquiridos de Harlan (Oxfordshire, Reino Unido). Además del modelo experimental de ratón, se han usado ratas Wistar albinas machos de entre 150 y 200g, de 8 a 10 semanas de edad para los experimentos de medida de aniones superóxido en islotes.

Todos los animales comentados anteriormente fueron mantenidos en un ciclo luz/oscuridad de 12 horas cada uno, a una temperatura constante de 20± 2°C, una humedad relativa de 40± 5% en los estabularios de la Universidad de Málaga y del King's College London o bien a una temperatura de 21± 2°C y una humedad relativa de 55± 5% según las condiciones del estabulario del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Sao Paulo (Brasil) y con libre acceso a comida y agua. Cuando fue necesario, los animales se sacrificaron por dislocación cervical (ratones) o por inhalación de CO₂ y posterior decapitación (ratas).

Los procedimientos experimentales llevados a cabo con ratones se realizaron en los estabularios de la Facultad de Medicina de Málaga y en la Facultad de Medicina y Ciencias de la Vida del King's College London (Reino Unido). Las muestras obtenidas fueron procesadas en Málaga y en Londres en los laboratorios de Medicina Regenerativa y Hormonas del Hospital Regional de Málaga y en los laboratorios del grupo Diabetes Research del King's College London, respectivamente.

Los experimentos fueron realizados de acuerdo a la directiva de la Unión Europea sobre la protección de animales usados con fines científicos (2010/63/EU). Los procedimientos experimentales realizados en Málaga fueron autorizados por el Comité de Ética de la Universidad de Málaga (CEUMA), códigos 2012-0002-A, 2013-

0002-A y 2014-0002-A. Los procedimientos llevados a cabo con ratones en el King's College London, fueron aprobados por el Comité ético del propio King's College London, según el UK Home Office Animals (que regula las licencias para trabajar con animales de experimentación) de acuerdo a los Scientific Procedures, Act 1986. Las ratas empleadas en nuestros estudios procedían del Estabulario del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Sao Paulo (Brasil), y los tejidos extraídos de ellas fueron procesados en el Departamento de Fisiología y Biofísica del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Sao Paulo, de acuerdo con la normativa del Comité de Experimentación de Animales del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Sao Paulo, Brasil (107/2005) para el cuidado de animales de laboratorio.

3.2 FÁRMACOS

Para la realización de los experimentos diseñados en el presente estudio, se han utilizado agonistas específicos de los receptores cannabinoides CB1 y GPR55, antagonistas/agonistas inversos específicos de dichos receptores y un inhibidor de la vía de señalización mTORC1.

El agonista de CB1 usado fue el araquidonil-2'-cloroetilamida, o ACEA, un potente y altamente selectivo agonista de los receptores CB1 ($K_i = 1.4\text{nM}$). Este compuesto es 1400 veces más selectivo para los receptores CB1 que para los receptores CB2 y se ha demostrado su actividad *in vivo* (Hillard *et al.*, 1999). El ACEA fue adquirido de Tocris Bioscience (Bristol, Reino Unido), número de catálogo 1319.

Como agonista de GPR55 se empleó el compuesto conocido como Abnormal cannabidiol (Abn-CBD), un regioisómero sintético del cannabidiol (principal componente cannabinoide de la planta de cannabis), y que representa hasta un 40% de sus extractos, no actuando sobre los receptores CB1 o CB2 (Járai *et al.*, 1999). Abn-CBD se considera el agonista sintético más potente y selectivo del receptor GPR55 (McKillop *et al.*, 2013). Este compuesto fue adquirido de Cayman Chemicals Inc (Ann Arbor, MI, Estados Unidos), número de catálogo 10004259.

Uno de los antagonistas/agonistas inversos de los receptores CB1 que se han usado en esta memoria ha sido el compuesto SR141716A, también denominado rimonabant. El rimonabant, fue el primer antagonista/agonista inverso de CB1 que se desarrolló y ha sido ampliamente utilizado como herramienta para investigar las

propiedades del receptor CB1 (Rinaldi-Carmona *et al.*, 1994). Este compuesto fue adquirido de Cayman Chemicals Inc (Ann Arbor, MI, Estados Unidos), número de catálogo 9000484.

Otro de los antagonistas/agonistas inversos de CB1 empleados en esta tesis ha sido el compuesto LH-21, un triazol que actúa como cannabimimético. Esta molécula, en el rango nanomolar interfiere con la acción de potentes agonistas del receptor CB1 como WIN 55,212-2, actuando como un antagonista neutro del mismo, tanto *in vivo* como *in vitro* (Jagerovic *et al.*, 2004). Asimismo, su permeabilidad a través de la barrera hematoencefálica es baja, por lo que se le considera un antagonista de acción periférica. LH-21 fue también adquirido de Cayman Chemicals Inc (Ann Arbor, MI, Estados Unidos), número de catálogo 13453.

Como inhibidor de mTORC1 se empleó la rapamicina, conocido antifúngico e inmunosupresor. La rapamicina inhibe selectivamente a mTORC1 y bloquea la subsecuente activación de la quinasa p70S6 (IC₅₀= 50pM) y por tanto de la vía de señalización mTORC1. Este fármaco fue adquirido de Calbiochem-Merck Millipore (Nottingham, Reino Unido), catálogo número 553210.

Las dosis de estos cinco compuestos empleadas en los experimentos descritos en esta tesis doctoral, fueron seleccionadas en base a estudios previos (algunos de ellos publicados por nuestro propio grupo de investigación), con vistas a asegurar la especificidad de su acción.

3.3 GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN MODELO ANIMAL DE PRE-DIABETES INDUCIDO POR UNA DIETA HIPERCALÓRICA ALTA EN GRASA

Hemos desarrollado un modelo animal de obesidad y pre-diabetes inducido por el consumo prolongado de una dieta hipercalórica alta en grasas saturadas, que genera en primer lugar obesidad y posteriormente intolerancia a glucosa y resistencia a la insulina, dos características típicas de la pre-diabetes. Para obtener el modelo de enfermedad indicado, se emplearon 20 ratones C57BL/6J de cada tanda de 10 semanas de edad, los cuales fueron distribuidos en dos grupos. A cada grupo se le suministró una dieta diferente, la cual consumieron hasta que fueron sacrificados (aproximadamente a las 16-18 semanas). Las dos dietas fueron las siguientes: a) dieta con un 10% en grasa (Research Diets Inc, New Brunswick, NJ, Estados Unidos, y b) dieta enriquecida en grasas saturadas (45% en grasa) (Research Diets). La

composición detallada de cada tipo de dieta se muestra en la **Fig. 1**. Los ratones que consumieron esta última dieta, con un alto contenido en grasa, desarrollaron obesidad y pre-diabetes.

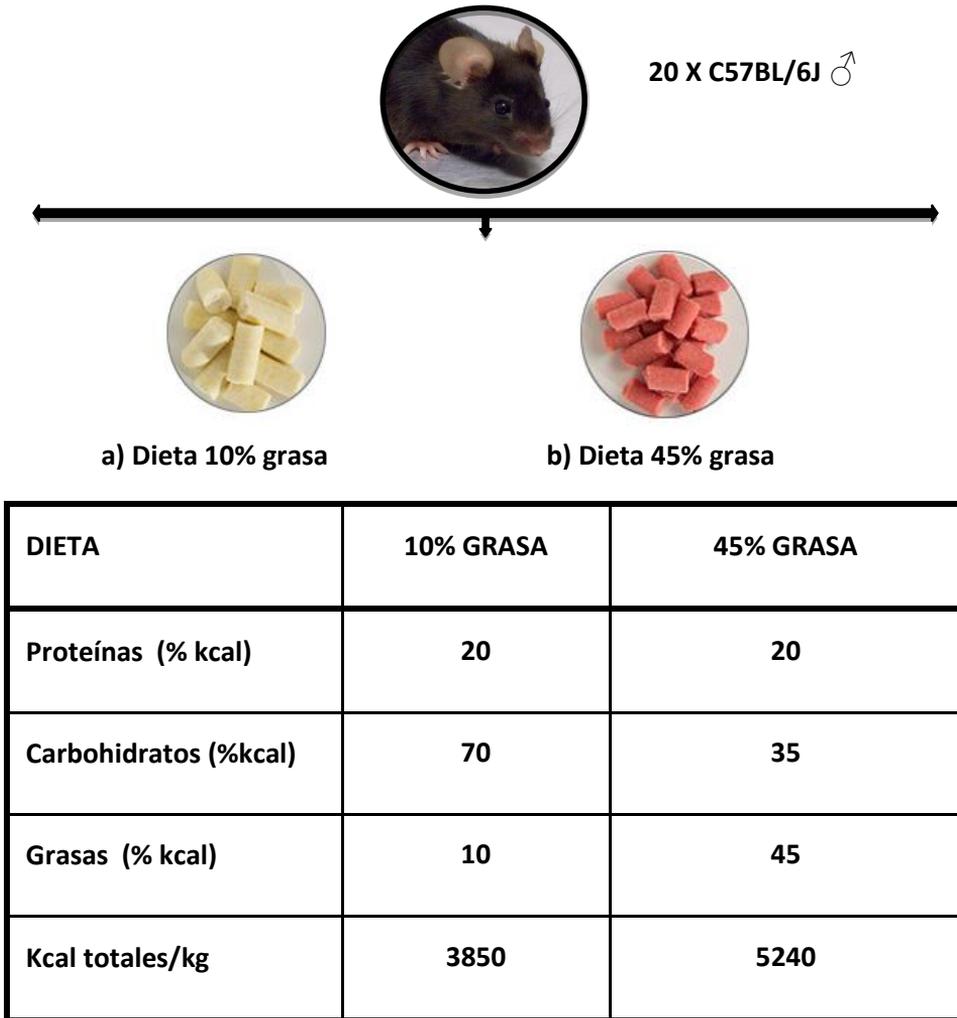


Figura 1. Esquema que describe el **porcentaje correspondiente a kilocalorías (% kcal)** de proteínas, carbohidratos, grasas y kcal totales por kg de los dos tipos de dieta empleados (dieta con 10% en grasa y dieta con 45% en grasa).

Dos veces por semana, se registró el peso de los animales correspondientes a cada uno de los dos grupos con el fin de realizar las correspondientes curvas de ganancia de peso. Periódicamente, también se realizaron las pruebas diagnósticas para

determinar la tolerancia a glucosa y la resistencia a la insulina. Para medir la tolerancia a la glucosa se empleó el test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal o GTT, según la abreviatura en inglés y para medir la resistencia a la insulina se utilizó el test de tolerancia a la insulina (ITT). Dichos test se llevaron a cabo como se indica a continuación:

- El GTT se realizó en torno a las 8 semanas de comenzar las dos dietas, de acuerdo a la experiencia previa de nuestro grupo que demuestra que en torno a este periodo de tiempo los animales con la dieta alta en grasa desarrollan intolerancia a glucosa. Se emplearon 8 ratones de cada grupo. Tras un ayuno nocturno de 12 horas, a los ratones se les inyectó glucosa intraperitonealmente al 40% (en solución salina) y en función del peso de los mismos (0.2ml/40g; 2g/kg), y posteriormente se midió la glucosa en sangre extraída de la cola con un glucómetro comercial (Accu-check, Roche Diagnostic) a los 15, 30, 45, 60 y 120min. Previamente se midió la glucosa basal.
- El ITT se realizó en torno a las 10 semanas, según nuestra experiencia previa con este modelo, empleando igualmente 8 ratones de cada dieta. El procedimiento de realización de este test fue exactamente idéntico al GTT, salvo que se inyectó insulina (insulina humana Actrapid, Novo-Nordisk, 0.75U/kg peso ó 0.2ml/20g) en lugar de glucosa a los animales.

Una vez que se observó obesidad en los animales, medida la glucosa basal, y comprobada la intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina, se extrajo sangre de los mismos y posteriormente se sacrificaron (semanas 16-18). A partir de la sangre obtenida también se midieron los niveles plasmáticos de hormonas como la insulina (ELISA, Mercodia, Upsala, Sweden) leptina (ELISA, BioVendor, Kassel, Alemania) y glucagón (EIA RayBiotech, Norcross, Estados Unidos). Para la medición de estas hormonas, se siguieron las instrucciones del proveedor del kit diagnóstico de ELISA ó EIA.

La generación de animales pre-diabéticos fue repetida tres veces durante esta tesis doctoral, con objeto de obtener el mínimo, pero suficiente, número de muestras para realizar los experimentos planteados.

3.4 MÉTODOS DE AISLAMIENTO DE ISLOTES PANCREÁTICOS DE ROEDORES

El método de aislamiento de islotes pancreáticos de rata empleado en esta tesis ha sido el descrito por Lacy y Kostianovsky en 1967, perfundiendo el páncreas con colagenasa (0.68mg/ml) (tipo V, de Sigma-Aldrich) diluida en medio de aislamiento HANK's (0.137M NaCl, 5.4mM KCl, 0.25mM Na₂HPO₄, 0.44mM KH₂PO₄, 1.3mM CaCl₂, 1.0mM MgSO₄, 4.2mM NaHCO₃, 10mM de glucosa, con un pH de 7.4) con albúmina 1g/L y antibióticos (100U/ml de penicilina y 0.1mg/ml de estreptomycin) mediante la canulación a través del conducto biliar. Una vez extraído el páncreas, se digirió durante 10min en un baño a 37°C, que es la temperatura óptima que requiere la colagenasa para disgregar el tejido exocrino del endocrino. Posteriormente, los islotes fueron separados y concentrados por centrifugación (27min a 900xg) en una solución de Histopaque (Sigma-Aldrich). Finalmente, los islotes fueron incubados toda la noche en medio RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific), suplementado con suero fetal bovino (FBS) (Invitrogen-GIBCO) al 10%, 100U/ml de penicilina y 0.1mg/ml de estreptomycin (Invitrogen-GIBCO), a una concentración de 7mM de glucosa, a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂ y un 95% de O₂. Todo el procedimiento fue realizado en condiciones asépticas, en una cabina de flujo laminar de clase II del laboratorio de cultivos celulares.

Para el aislamiento de islotes pancreáticos de ratón, se siguió el mismo procedimiento (Lacy *et* Kostianovsky, 1967) empleado en ratas con ligeras variaciones, inyectando la colagenasa en diferentes zonas del páncreas en lugar de perfundirla a través del conducto biliar (islotes aislados en el Laboratorio de Hormonas del Hospital Regional de Málaga, (**Fig. 2**) o bien mediante canulación del conducto biliar (islotes aislados en el King's College London). El páncreas, junto con la colagenasa diluida en medio de aislamiento, se incubó durante 7min en un baño a 37°C y en agitación. El medio de aislamiento empleado contenía los siguientes reactivos (en mM); 115 NaCl, 10 NaHCO₃, 5 KCl, 1.1 MgCl₂, 1.2 NaH₂PO₄, 2.5 CaCl₂ y 25 HEPES, albúmina al 1% (Sigma-Aldrich) y 5mM de glucosa (pH de 7.35). Finalmente, los islotes se recolectaron manualmente bajo la lupa empleando una micropipeta y se incubaron durante toda la noche en medio RPMI 1640 (11mM de glucosa) suplementado con FCS al 10%, antibióticos (100U/ml de penicilina y 0.1mg/ml de estreptomycin) y 2mM de L-glutamina (Invitrogen-GIBCO). Un resumen visual de los pasos fundamentales del protocolo se muestra en las siguientes fotografías (**Fig. 2**):



Figura 2. Aislamiento de islotes pancreáticos de ratón, resumido en seis imágenes que representan los pasos fundamentales del protocolo.

3.5 ISLOTES DE LANGERHANS HUMANOS

Los islotes humanos fueron aislados a partir del páncreas de donantes no diabéticos, cedidos al laboratorio de la Dra. Persaud (Diabetes Research, King's College London, Londres, Reino Unido, donde se realizaron estos experimentos), por el grupo de investigación dirigido por el Dr. Huang de la Unidad de Trasplante de Islotes del Hospital King's College London, Londres, (Reino Unido). Los islotes se obtuvieron empleando métodos estándares de aislamiento y purificación de islotes humanos siguiendo los protocolos éticos establecidos para el manejo de muestras humanas (Huang *et al.*, 2004). Se usaron islotes procedentes de un total de 15 donantes. Una vez llegados al laboratorio, los islotes fueron mantenidos en medio CMRL-1066 (Sigma-Aldrich, Dorset, Reino Unido) hasta un máximo de 48 horas a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂ y un 95% de O₂ antes de su uso experimental.

3.6 PROTOCOLO DE TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO *IN VIVO* PARA EL ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA EN ISLOTES PANCREÁTICOS

Tras una ayuno de 12 horas, los ratones alimentados durante 16-18 semanas con las diferentes dietas empleadas (dieta estabulario, dieta al 10% en grasa y dieta al 45% en grasa) se inocularon intraperitonealmente con el antagonista del receptor CB1, rimonabant (0.1mg/kg peso) o con vehículo (etanol al 0.1% en suero salino). A los 15min de la inyección, les fue administrado un bolo intraperitoneal de glucosa de 2g/kg de peso corporal a partir de una solución de glucosa al 40% en suero salino. Diez minutos después, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. A continuación, los islotes pancreáticos fueron aislados y purificados según los métodos de aislamiento descritos en el apartado 3.4. Finalmente, los islotes de cada animal se reunieron en un tubo Eppendorf y se lavaron dos veces en una solución de lavado (para 100ml: 0.701g de NaCl, 0.0372g de KCl, 0.21g de NaHCO₃, 0.0223g de MgCl₂·6H₂O) centrifugándose durante 10min a 300xg y 4°C. El sobrenadante final fue descartado y el pellet (los islotes) se guardó congelado a -80°C hasta la medición de la expresión proteica por Western blot.

3.7 PROTOCOLO DE TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO *IN VITRO* PARA EL ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA EN ISLOTES PANCREÁTICOS

3.7.1 Tratamiento *in vitro* con rimonabant, rapamicina o ambos

En otro tipo de experimentos, tras el aislamiento y purificación de unos 600 islotes pancreáticos procedentes de 3 ratones C57BL/6J de entre 10 y 12 semanas de edad, éstos se incubaron toda la noche en medio RPMI (Invitrogen-GIBCO) con FCS al 10%, una concentración de glucosa de 11mM, 2mM de L-glutamina y antibióticos (100U/ml de penicilina y 0.1mg/ml de estreptomycin) a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂ y un 95% de O₂. Al día siguiente, los islotes fueron incubados en medio de secreción (100ml a 10x: 8.182g de NaCl, 0.335g de KCl, 0.203g de MgCl₂·6H₂O, 4.766g de HEPES, 0.368g de CaCl₂·2H₂O a un pH de 7.35) con baja concentración de glucosa (3mM) durante 2 horas, a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂ y un 95% de O₂. Pasado este tiempo, grupos de 200 islotes de un tamaño homogéneo fueron separados en tres placas de Petri estériles para estimular la secreción de insulina (a 11mM de glucosa) en presencia de los diferentes fármacos, estableciéndose las siguientes condiciones experimentales e incubando durante 15min + 15min a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂ y un 95% de O₂:

- Placa 1: Vehículo (etanol 0.01%) + Vehículo (etanol 0.01%)
- Placa 2: Vehículo (etanol 0.01%) + Rimonabant (0.1µM)
- Placa 3: Rapamicina (3nM) + Rimonabant (0.1µM)

Después de lavar los islotes de igual modo a como se ha descrito en el apartado 3.6, se congelaron a -80°C hasta efectuar el análisis de la expresión proteica mediante Western blot. Estos experimentos fueron realizados en el laboratorio de Hormonas del Hospital Regional de Málaga.

3.7.2 Tratamiento *in vitro* con LH-21 y Abn-CBD

Tras el aislamiento y purificación de los islotes pancreáticos, 1000 islotes de ratones C57BL/6J de entre 8 y 10 semanas de edad, ó 1000 islotes humanos se incubaron toda la noche en medio DMEM (Sigma-Aldrich) conteniendo 1000mg de glucosa/L, 2mM de L-glutamina y antibióticos (100U/ml de penicilina y 0.1mg/ml de estreptomycin) a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂ y un 95% de O₂. Al día siguiente, grupos de 200 islotes de un tamaño homogéneo fueron separados en placas de Petri estériles y posteriormente tratados bien con LH-21 (0.1µM), con Abn-

CBD (10 μ M) o con vehículo (DMSO al 0.01%) disueltos en medio DMEM con baja glucosa (1000mg de glucosa/L) o alta glucosa (4500mg de glucosa/L), durante 30min a 37°C.

Después de lavar los islotes de igual modo a como se ha descrito en el apartado 3.6, se congelaron a -80°C hasta efectuar el análisis de la expresión proteica mediante Western blot.

3.8 DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEICA MEDIANTE WESTERN BLOT

Las proteínas de los islotes pancreáticos aislados de ratones sometidos a las tres dietas ensayadas (dieta estabulario, dieta al 10% en grasa y dieta al 45% en grasa), de ratones C57BL/6J sanos no sometidos a dietas o de islotes humanos, fueron extraídas empleando un tampón de extracción de proteínas RIPA (Santa Cruz Biotechnology) suplementado con inhibidores de proteasas, PMSF diluido en DMSO (200mM) y ortovanadato de sodio diluido en agua (100mM). Además, a este tampón de lisis se le añadió inhibidores de fosfatasa (PhosSTOP) adquirido de Sigma-Aldrich (Dorset, Reino Unido). Un volumen de 40 μ l del tampón de lisis completo, se añadió a un tubo Eppendorf 1.5ml conteniendo un precipitado de unos 200 islotes previamente congelados a -80°C, en el caso de islotes aislados de ratones. Posteriormente, con una jeringa de insulina (con una aguja de 0.5mm X 16mm) los islotes se resuspendieron 4-5 veces y se centrifugaron durante 30min a 13200rpm en una microcentrífuga convencional para tubos Eppendorf. Para los islotes humanos, el volumen inicial de este tampón de lisis fue de 80 μ l, y los islotes se sometieron a dos pulsos de ultrasonido (con un sonicador Soniprep 150, Richmond Scientific, Reino Unido) durante dos pulsos de 10 segundos a una intensidad de 10W y fueron centrifugados a 8000xg durante 10min a 4°C. En los sobrenadantes obtenidos se cuantificaron las proteínas, bien por el método de Bradford (Coomasie Bradford Protein Assay kit, Thermo Fisher Scientific) en el Laboratorio de Hormonas del Hospital Civil de Málaga, o por el método del ácido bicinónico (BCA Protein Assays, Thermo Fisher Scientific) en el laboratorio del King's College London.

A continuación, 25-40 μ g proteína/pocillo fueron separadas por SDS-PAGE empleando geles de poliacrilamida al 12% y de 1.5mm de espesor. Después de la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF, bloqueadas con un tampón TBST (a partir de tris base salino (TBS) 10X para 1L: 24.2g de Tris base, 80g de NaCl a un pH de 7.6 y 0.1% de Tween-20 en TBS 1x) con albúmina al 5% durante 1

hora a temperatura ambiente e incubadas durante toda la noche con cada uno de los anticuerpos primarios empleados a 4°C (a una dilución 1:1000 en tampón de bloqueo o TBST al 5% albúmina).

Los anticuerpos primarios utilizados (ver **tabla 1**) en los experimentos que han sido llevados a cabo en esta tesis fueron desarrollados en conejo (salvo el anti β -actina) y reconocen a las siguientes proteínas: P-Akt, Akt, P-CREB, CREB, P-AMPK, AMPK, P-p70S6K, p70S6K (todos estos anticuerpos primarios fueron adquiridos de Cell Signaling salvo el anti β -actina), al receptor cannabinoide CB1 (Cayman Chemical Inc) y al receptor GPR55 (Abcam, Cambridge, Reino Unido). Estos últimos anticuerpos que reconocen a ambos receptores se utilizaron a una dilución 1:100.

Tras varios lavados con TBST se añadió el correspondiente anticuerpo secundario marcado con peroxidasa (anti-conejo desarrollado en cabra, de Promega, salvo para la β -actina, ver más adelante) a una dilución 1:10000. La incubación se llevó a cabo durante 1 hora a temperatura ambiente en todos los casos.

Finalmente, las proteínas fueron visualizadas mediante revelado quimioluminiscente empleando el kit Western Blotting Luminol Reagent, de Santa Cruz Biotechnology. La cantidad de cada una de estas proteínas se determinó posteriormente por densitometría. Las bandas se cuantificaron empleando el programa informático ImageJ, versión 1.49o (NIH, Estados Unidos).

Como control de carga de todos los experimentos se empleó la β -actina. Su reconocimiento se llevó a cabo con un anticuerpo primario desarrollado en ratón (1:5000) (Sigma-Aldrich) y un secundario anti-ratón (Promega) desarrollado en cabra (1:10000).

Se realizaron sucesivos “stripping” de las membranas, con el fin de poder reutilizarlas incubándolas con otros anticuerpos primarios diferentes. Para ello, después del revelado con luminol, las membranas fueron lavadas en tampón TBST durante toda la noche a 4°C y en agitación. Al día siguiente se incubaron durante 30min a 50°C y en agitación con 10ml de tampón de stripping (100ml de buffer de “stripping”: 400 μ l de SDS al 10%, 14.28ml de Tris HCl pH 6.8 a 0.5M, 85.320ml de H₂O destilada) y 50 μ l de β -mercaptoetanol. Finalmente, las membranas fueron lavadas de nuevo varias veces con TBST e incubadas durante toda la noche a 4°C en el mismo tampón de lavado antes de bloquearlas de nuevo con TBST y albúmina al 5% y añadir un nuevo anticuerpo primario.

Anticuerpo para la proteína	Especie en la que ha sido desarrollado	Dilución empleada	Casa comercial	Número de referencia
P-Akt	Conejo	1:1000	Cell Signaling	4060
Akt	Conejo	1:1000	Cell Signaling	9272
P-CREB	Conejo	1:1000	Cell Signaling	9198
CREB	Conejo	1:1000	Cell Signaling	9104
P-p70S6K	Conejo	1:1000	Cell Signaling	9205
p70S6K	Conejo	1:1000	Cell Signaling	2708
P-AMPK	Conejo	1:1000	Cell Signaling	2535
AMPK	Conejo	1:1000	Cell Signaling	2532
CB1	Conejo	1:100	Cayman	101500
GPR55	Conejo	1:100	Abcam	ab174700
β-actina	Ratón	1:5000	Sigma-Aldrich	A2228

Tabla 1. Anticuerpos primarios empleados en esta tesis doctoral para el estudio de las proteínas analizadas mediante Western blot.

3.9 MEDIDA DEL Ca^{2+} INTRACELULAR EN LAS CÉLULAS β DE LOS ISLOTES PANCREÁTICOS

Para medir las oscilaciones en los niveles de Ca^{2+} intracelular de las células β ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) usamos una técnica microfluorométrica que emplea como sonda de reconocimiento de Ca^{2+} el compuesto Fura-2. Esta sonda queda secuestrada en el interior celular y se une de manera específica al Ca^{2+} libre, emitiendo luz a 510nm cuando es excitada a 340 y 380nm. Mientras que la intensidad de emisión a 340nm incrementa en presencia de Ca^{2+} , la intensidad de emisión a 380nm disminuye, siendo la relación de intensidades de fluorescencia a 340nm y 380nm directamente proporcional a la concentración de Ca^{2+} e independiente de la concentración de la sonda.

Para registrar los cambios en los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de las células β , grupos de 200 islotes de ratones o de humanos se separaron individualmente con la enzima acutasa (Thermo Fisher Scientific) (200 μL por cada 200 islotes) en un baño a 37°C, con débil agitación durante 4min. Posteriormente, los islotes se transfirieron a placas estériles de 6 pocillos. Cada pocillo contenía un cubreobjeto de 2.2cm de diámetro que se trató previamente con etanol al 100% durante 5min, para permitir la unión de los islotes. A continuación, los islotes se incubaron toda la noche en medio RPMI 1640 suplementado con 5.5mM de glucosa, FBS al 10%, 2mM de L-glutamina y antibióticos (100U/ml de penicilina y 0.1mg/ml de estreptomycin) a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO_2 y un 95% de O_2 . Al día siguiente, se añadió la sonda de Ca^{2+} Fura-2 AM (Thermo Fisher Scientific) a una concentración de 5 μM durante 40min 37°C. Pasado ese tiempo, el cubreobjeto con los islotes se colocó en una cámara de perfusión a 37°C acoplada a un microscopio de fluorescencia (Carl Zeiss Axiovert 135, Estados Unidos, objetivo 20x). La cámara de perfusión permite un flujo constante de 1ml/min de las soluciones fisiológicas empleadas (2mM ó 20mM de glucosa en medio Gey & Gey (Gey *et Gey*, 1936) (en mM: 111 NaCl, 27 NaHCO_3 , 5 KCl, 0.22 KH_2PO_4 , 0.28 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, pH 7.4) a 37°C y en ausencia o presencia de los cannabinoides sintéticos LH-21 o Abn-CBD, ambos ensayados a 0.1, 1 y 10 μM), mientras se monitorizan continuamente los niveles de fluorescencia con el objetivo de 20x. Estos niveles son adquiridos mediante una cámara digital y se procesan informáticamente éstos para obtener una representación de los cambios en la relación fluorescencia a 340/ fluorescencia a 380nm en función del tiempo.

En estos experimentos, que se realizaron en el laboratorio de la Dra. Persaud (King's College London) la máxima concentración de DMSO que se usó como vehículo de la disolución de cannabinoides empleados fue 0.04% y como estimuladores de la movilización de Ca^{2+} se usaron ATP a $100\mu\text{M}$, tolbutamida a $50\mu\text{M}$ o carbacol a $500\mu\text{M}$ (todos ellos de Sigma-Aldrich).

3.10 EXPERIMENTOS *IN VITRO* DE SECRECIÓN ESTÁTICA DE INSULINA ESTIMULADA POR GLUCOSA

En estos experimentos de secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS) se emplearon islotes aislados de ratones que consumieron cada una de las tres dietas mencionadas en el apartado 3.3 (dieta estabulario, dieta al 10% en grasa y dieta al 45% en grasa). Tras el aislamiento, los islotes se incubaron 24 horas en medio RPMI 1640 con 11mM de glucosa, FCS al 10%, 2mM de glutamina, y antibióticos (100U/ml de penicilina y 0.1mg/ml de estreptomina).

Al día siguiente, los islotes se pre-incubaron en medio de secreción (100ml a 10X: 8.182g de NaCl, 0.335g de KCl, 0.203g de $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 4.766g de HEPES, 0.368g de $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ a un pH de 7.35) a 3.3mM de glucosa, durante 2 horas a 37°C . Posteriormente, se establecieron 5 condiciones experimentales, empleando 5 islotes en cada pocillo y 6 réplicas por condición experimental, sembrando los islotes en pocillos de placas de 24. Las 5 condiciones experimentales fueron las siguientes: a) islotes no estimulados (en medio de secreción 3mM de glucosa), b) islotes estimulados (en medio de secreción 11mM de glucosa), c) islotes tratados con rimonabant $0.1\mu\text{M}$ (en medio de secreción 11mM de glucosa), d) islotes tratados con rapamicina 3nM (en medio de secreción 11mM de glucosa) y e) islotes pre-tratados con rapamicina a 3nM durante 15min y posteriormente con rimonabant a $0.1\mu\text{M}$ (en medio de secreción 11mM de glucosa). Los islotes fueron incubados durante 1 hora a 37°C con objeto de que secretaran suficiente insulina al medio de cultivo para su posterior cuantificación.

Finalmente, los islotes se recolectaron, se lavaron en solución de perfusión, centrifugando a 300xg, 10min a 4°C y se congelaron a -80°C para la posterior cuantificación del contenido proteico. El medio de secreción de cada pocillo se centrifugó también a 300xg, 10min a 4°C y se congeló a -20°C para cuantificar *a posteriori* la insulina presente mediante un kit ELISA (Mercodia, (ver apartado 3.11).

Experimentos similares de GSIS, siguiendo básicamente el mismo protocolo, fueron realizados en el laboratorio de la Dra. Persaud con los ligandos LH-21 y Abn-CBD a 0.1, 1 y 10 μ M. En estos casos, las incubaciones estimuladoras se llevaron a cabo a 20mM de glucosa durante 1 hora a 37°C, y se utilizaron islotes procedentes de ratones ICR, CD-1, C57BL/6J, WT y KO de GPR55 (GPR55^{-/-}) e islotes humanos. En este caso, la concentración de insulina en los medios se determinó mediante radioinmunoensayo (ver apartado 3.13).

3.11 DETERMINACIÓN DE INSULINA MEDIANTE EL MÉTODO ELISA

En algunos experimentos (los realizados en el laboratorio de Hormonas del Hospital Regional de Málaga) la insulina producida por los islotes fue medida empleando la técnica de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Para ello se empleó un kit comercial del proveedor Mercodia, siguiéndose las instrucciones del fabricante. El kit está basado en la técnica de sándwich directo, que emplea un anticuerpo monoclonal de captura adherido a los pocillos de la placa de ELISA y un segundo anticuerpo monoclonal conjugado con peroxidasa de rábano que reconoce a la insulina una vez que ésta ha sido fijada al anticuerpo de captura. Una vez eliminado mediante lavado el anticuerpo conjugado sobrante se añade el sustrato cromogénico 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) que es oxidado por la peroxidasa, produciendo un derivado que una vez parada la reacción con HCl puede ser medido espectrofotométricamente en el lector de ELISA a 450nm. El kit utiliza una serie de patrones de insulina de concentración conocida con los que es posible confeccionar una recta patrón que permite la determinación de la insulina de la muestra problema por interpolación.

3.12 EXPERIMENTOS *IN VITRO* DE SECRECIÓN DINÁMICA DE INSULINA USANDO UN SISTEMA DE PERIFUSIÓN

Se realizaron también experimentos *in vitro* de secreción dinámica de insulina. Para ello, grupos de 40 islotes de ratones ICR, C57BL/6J WT y C57BL/6J GPR55 KO ó 50 islotes humanos se transfirieron a cámaras con filtros de nylon que contenían poros de 1 μ m de tamaño para impedir la pérdida de los islotes durante la perifusión.

El sistema de perfusión utilizado poseía 16 cámaras (se emplearon 4 cámaras por cada condición experimental) y dos bombas de perfusión (Persaud *et al.*, 2007). Los medios empleados se mantuvieron en un baño a 37°C.

Los islotes se sometieron a 2mM de glucosa en medio Gey & Gey (Gey *et Gey*, 1936) durante 1 hora a un flujo de 0.5ml/min, y seguidamente se aplicó el protocolo de secreción dinámica de insulina consistente en 10min a 2mM de glucosa, 20min a 20mM de glucosa, 20min a 20mM de glucosa más el fármaco empleado (LH-21 o Abn-CBD o vehículo) y finalmente, 20min a 20mM de glucosa (véase **Fig. 3**). Todos ellos en medio Gey & Gey (Gey *et Gey*, 1936). Durante todo este protocolo el flujo se mantuvo a 0.5ml/min.

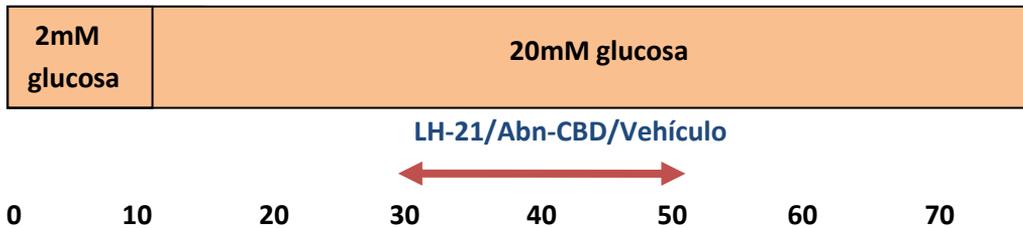


Figura 3. Esquema del protocolo llevado a cabo durante la **secreción dinámica de insulina**, que tenía una duración total de 70min. Los 10 primeros minutos los islotes fueron perfundidos a 2mM de glucosa y los 60min restantes a 20mM de glucosa. El tratamiento con los cannabinoides o vehículo se estableció entre los minutos 20 y 40 de la perfusión con 20mM de glucosa, o sea, entre los minutos 30 y 50 de la perfusión.

Los medios de secreción de los islotes se recolectados cada 2min durante los 70min del experimento y se congelaron a -20°C para la posterior cuantificación de insulina. En los casos en que la insulina podía ser medida en las siguientes 24 horas, se guardaba el medio a una temperatura de 4°C. La concentración de insulina liberada se determinó por radioinmunoensayo (ver siguiente apartado).

Los fármacos, LH-21 y Abn-CBD, fueron ensayados a concentraciones de 0.001, 0.01, 0.1, 1 y 10µM. Como vehículo se empleó DMSO, por debajo de 0.04%.

3.13 DETERMINACIÓN DE INSULINA POR RADIOINMUNOENSAYO

El radioinmunoensayo (RIA), desarrollada por Yalow y Salomon en los años 60, es una técnica altamente sensible, en el rango de pico-gramos, y específica para la cuantificación de sustancias de muy diferente naturaleza (insulina, por ejemplo) (Schwartz, 1973; Yalow, 1991; Kahn *et Roth*, 2004).

El RIA es una técnica inmunológica competitiva, donde un antígeno marcado radiactivamente (trazador) (Ag^*) compite con el mismo antígeno (Ag) no marcado, presente en la muestra o en estándares de concentración conocida, por su unión a una cantidad fija y limitada de anticuerpo (Ab). Dicha cantidad de Ab se elige de forma que éste sea capaz de unir entre el 50-70% de una cantidad fija de Ag^* en la muestra de ensayo. Esta relación entre el Ab y el Ag^* permite asegurar que el número de epitopos presentados por el Ag^* siempre exceda al número total de lugares de unión del Ab , y así, el Ag^* y Ag pueden competir. En el RIA se precisa también separar los complejos antígeno-anticuerpo (Ag^*-Ab y $Ag-Ab$) del antígeno que permanece libre (Ag^* y Ag) y de un contador apropiado para medir la radiactividad. Se mide la radiactividad contenida en los complejos Ag^*-Ab de los diferentes puntos de la curva estándar y de la muestra problema (cuentas por minuto, cpm) representándose una curva estándar de la que pueden deducirse los valores de concentración de la muestra problema por interpolación.

En este ensayo, hemos usado como trazador insulina marcada con el isótopo radiactivo yodo-125, (I^{125}). El procedimiento se detalla a continuación:

Se descongelaron las muestras correspondientes a los medios de secreción de los islotes, recolectados en los experimentos de secreción estática o dinámica de insulina.

Se rotularon tubos de ensayo de 5ml para todas las muestras (por duplicado), para la curva de calibrado (por triplicado) y para los tubos de unión no específica (NSB), unión máxima (MB) y total (T). A continuación, se preparó la curva de calibrado a partir de un stock de insulina a 10ng/ml, y se hicieron diluciones seriadas a 1/2; 10, 5, 2.5, 1.25, 0.63, 0.32, 0.16, 0.08 y 0.04ng/ml.

Se añadió 100 μ l de cada muestra o estándar. Las muestras procedentes de experimentos de secreción estática, se diluyeron 1:4 con una solución salina de borato. A continuación se preparó el anticuerpo anti-insulina a una dilución 1:10 a partir de un stock a 1 μ g/ml y el trazador (insulina marcada con I^{125}) a una dilución que dependía del grado de radiactividad del isótopo radiactivo (vida media de 60 días),

pero que finalmente se ajustó a 100000cpm/ml en el contador de radiación gamma.

Tras añadir las muestras o estándares de insulina, a cada tubo se añadió un volumen de 100µl del anticuerpo y del trazador, de modo que el volumen final de cada tubo fue de 300µl, salvo en aquellos tubos de referencia marcados como T (Total), que sólo tenían 100µl de trazador. El volumen (µl) de la solución de borato, de anticuerpo, trazador, estándar de insulina y muestra de cada condición fue el indicado en la siguiente tabla:

Condición	Solución salina de borato	Anticuerpo	Trazador (I¹²⁵)	Estándar de insulina	Muestras
Curva de calibrado (10-0.04ng/ml)		100	100	100	
Total			100		
NSB	200		100		
MB	100	100	100		
Muestras		100	100		100

Seguidamente, se agitaron todos los tubos y se incubaron un mínimo de 48 horas a 4°C. Tras las 48 horas de incubación, se precipitaron las muestras centrifugándolas durante 15min a 3000rpm en una solución de polietilenglicol (PEG) al 12% diluido en tampón PBS, γ-globulinas, y Tween-20. No se precipitaron los tubos correspondientes a "T" (Total, sólo trazador). Tras la centrifugación, se aspiró el volumen de PEG presente en todos los tubos.

Por último, se midieron las cpm de cada uno de los tubos en un contador gamma acoplado a un ordenador, el cual confeccionó la curva estándar a partir de la cual determinó la concentración de insulina de las muestras por interpolación.

3.14 CUANTIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ROS EN ISLOTES TRATADOS CON LIGANDOS CANNABINOIDES

Con vistas a estimar la producción de especies reactivas de oxígeno, los niveles de anión superóxido en islotes fueron cuantificados por microscopia confocal, usando el método del dihidroetidio.

El dihidroetidio, también conocido como hidroetidina, es un colorante fluorescente permeable a las células que cuando penetra en ellas es capaz de formar, en presencia del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), 2-hidroxi-etidio. Esta molécula se intercala en el DNA y emite fluorescencia roja (560- 615nm) detectable mediante microscopía de fluorescencia cuando es excitada a 488nm.

En nuestros experimentos se empleó un microscopio confocal para detectar y registrar la intensidad de las señales fluorescentes emitidas por los islotes tratados con cannabinoides tras la incorporación del dihidroetidio. La cuantificación de la fluorescencia emitida por el 2-hidroxi-etidio producido, se llevó a cabo a partir de imágenes de alta resolución procesadas por densitometría mediante el programa informático ImageJ. La intensidad de fluorescencia emitida se normalizó con respecto al área de los islotes (Morgan *et al.*, 2007).

En la **Fig. 4** se muestra un esquema de la reacción producida entre el dihidroetidio y el anión superóxido para dar 2-hidroxi-etidio.

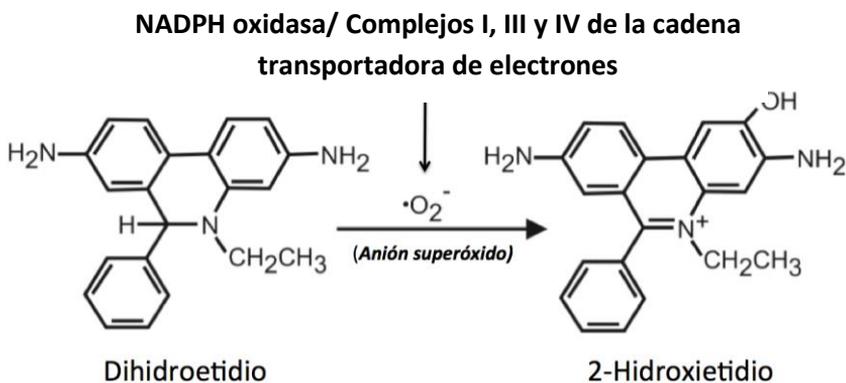


Figura 4. Reacción producida entre el dihidroetidio y el anión superóxido para dar 2-hidroxi-etidio el cual emite fluorescencia en el espectro del rojo.

A continuación se describen los experimentos en los que se determinaron los niveles de anión superóxido en islotes tratados con los cannabinoides ACEA, rimonabant y ACEA + rimonabant, tanto procedentes de ratas como de ratones.

3.14.1 Tratamiento de islotes de rata

Una vez aislados los islotes de rata, fueron incubados toda la noche en medio RPMI 1640 (7mM de glucosa) suplementado con FCS al 10% y antibióticos (100U/ml de penicilina y 0.1mg/ml de estreptomycin), a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂ y un 95% de O₂. Al día siguiente, los islotes fueron incubados 2 horas en medio RPMI 1640 con 3.3mM de glucosa a 37°C, también en una atmósfera con un 5% de CO₂ y un 95% de O₂. Después de dicho tratamiento, los islotes se trataron durante 1 hora con 0.1µM de ACEA o vehículo (DMSO al 0.2%) a 3.3mM y 16.7mM de glucosa en medio Krebs-Henseleit (118mM NaCl, 4.7mM KCl, 1.2mM KH₂PO₄, 2.5mM CaCl₂, 1.2mM MgSO₄, 25mM NaHCO₃, con un pH de 7.4) en un baño a 37°C y en agitación. En cada una de las condiciones experimentales, se emplearon 20 islotes.

El protocolo para el tratamiento con rimonabant a 0.1µM fue exactamente el mismo que el del ACEA, si bien el tiempo de incubación fue de 3 horas. Como vehículo se empleó etanol al 0.2%. El protocolo para el tratamiento conjunto de rimonabant y ACEA, se llevó a cabo incubando primero 3 horas sólo con 0.1µM de rimonabant y seguidamente 1 hora con ACEA a 0.1µM manteniendo el rimonabant.

Después del tratamiento con los cannabinoides, los islotes se incubaron con la sonda hidroetidina (Thermo Fisher Scientific) a 50µM durante 20min a temperatura ambiente, en oscuridad y en agitación. Finalmente, se determinó la producción de anión superóxido a través de la fluorescencia emitida y captada por microscopía confocal (LSM 510, Axiovert 100M, Carl Zeiss; Alemania). Estos experimentos en islotes de rata fueron realizados en el Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Sao Paulo, Brasil.

3.14.2 Tratamiento de islotes de ratón

Para los islotes de ratones se utilizó un protocolo similar al de ratas, pero el tiempo de incubación del rimonabant fue de 1 hora en lugar de 3 horas. Asimismo, el protocolo para los experimentos de tratamiento conjunto de rimonabant y ACEA se llevó a cabo incubando previamente con rimonabant (0.1µM) durante 15min y seguidamente con ACEA (0.1µM) durante 1 hora, manteniendo el rimonabant. Se

realizaron curvas dosis-respuesta de rimonabant y de ACEA a diversas concentraciones (0.1, 0.01 y 0.001 μ M).

Por otra parte, para el caso de los islotes de ratones se investigó la producción de anión superóxido tanto en aquellos procedentes de ratones sanos C57BL/6J WT como en otros procedentes de ratones pre-diabéticos. Las imágenes se realizaron con un microscopio LEICA (modelo SP5 II) ubicado en los servicios centrales de apoyo a la investigación de la Universidad de Málaga (SCAI).

3.15 MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DE LAS CASPASAS 3/7 PARA DETERMINAR EL NIVEL DE APOPTOSIS

Las caspasas son una gran familia de proteasas homólogas entre sí que se activan en las células cuando éstas reciben señales pro-apoptóticas extracelulares o intracelulares (Alnemri *et al.*, 1996). Estas proteasas producen rupturas detrás de los grupos carboxilo de residuos de aspartato en los enlaces peptídicos de las proteínas diana, de lo que se deriva su nombre: cisteinil-aspartato proteasas o caspasas. La caspasa más prevalente en la célula es la caspasa 3 que es la última responsable de la mayoría de los efectos apoptóticos junto con las caspasas 6 y 7. En este trabajo se han medido las actividades de las caspasas 3 y 7 como indicador de la capacidad apoptótica/supervivencia de los islotes de ratones y humanos.

La actividad de estas caspasas fue determinada usando el kit comercial Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega) que se basa en un ensayo luminiscente. Fue utilizado siguiendo las instrucciones del fabricante. El kit contiene un sustrato luminogénico cuya lisis mediada por caspasas 3/7 provoca la aparición final de luz cuya intensidad es proporcional a la actividad de dichas caspasas. Los detalles del procedimiento se indican en la **Fig. 5**:

Para realizar los experimentos de determinación de la actividad de las caspasas, los islotes pancreáticos aislados de ratones o humanos se estabilizaron en medio RPMI 1640 con 5.5mM de glucosa, FBS al 10%, 2mM L-glutamina, y antibióticos (100U/ml de penicilina y 0.1mg/ml de estreptomycin) durante toda la noche a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ y un 95% de O₂. Al día siguiente, los islotes se incubaron en ausencia o en presencia de LH-21 a 0.1 y 1 μ M, o Abn-CBD a 1 y 10 μ M durante 48 horas. Para estimular la apoptosis, los islotes se expusieron a un cóctel de citoquinas (IL-1 β a 0.5U/ μ l, TNF α a 5U/ μ l e INF γ a 5U/ μ l) durante 20 horas. Los

ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos donde se introdujeron 5 islotes / pocillo. Las lecturas de intensidad luminosa (después de añadir los reactivos del kit) se realizaron empleando un lector de microplacas de Promega (modelo Multi Detection System Glomax), a 490nm.

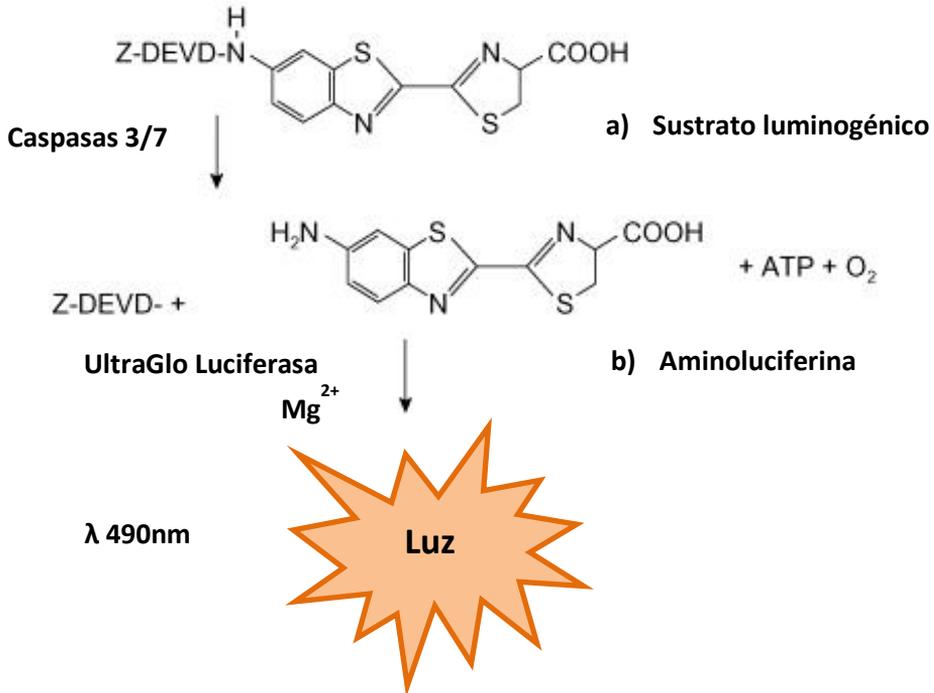


Figura 5. Esquema de la **determinación de caspasas** mediante ensayo con el **kit Caspase-Glo 3/7 Assay** (Promega). Las caspasas 3/7 llevan a cabo la escisión del sustrato luminogénico (a) que contiene la secuencia DEVD. De esta forma generan aminoluciferina (b), sustrato de la luciferasa, la cual originará finalmente una señal luminosa proporcional a la actividad de las caspasas 3/7.

3.16 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Todos los análisis estadísticos llevados a cabo en esta memoria se realizaron usando el programa informático Graphpad prism v.5.01 (Graphpad Inc.; La Jolla, Estados Unidos). Los resultados se presentan como la media de los valores \pm media del error estándar (S.E.M.) para cada grupo de experimentos comprobándose previamente una distribución normal de los datos. Los datos se analizaron a través del análisis de la varianza (ANOVA) de una sola vía o dos, según el diseño experimental y la *t* de Student. En el caso del análisis por ANOVA, se utilizó el post-test de comparaciones múltiples de Dunnett. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de $p < 0.05$.

IV. RESULTADOS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

4.1 GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN MODELO EXPERIMENTAL ANIMAL DE PRE- DIABETES INDUCIDA POR DIETA

Como hemos indicado en la sección de materiales y métodos (apartados 3.1 y 3.3) uno de los modelos animales utilizados en esta tesis ha sido el ratón C57BL/6J obeso y pre-diabético. Diferentes tandas de este modelo, hasta tres en el transcurso de este trabajo, han sido generadas en nuestro laboratorio mediante alimentación prolongada de estos ratones con una dieta alta en grasa (45% kilocalorías en forma de grasa) durante 16-18 semanas (para más detalle véase el apartado 4.3).

En la **Fig. 1** se muestra, a) una curva de ganancia de peso representativa, tanto para los animales controles (10% kilocalorías en forma de grasa) como para los animales inducidos a ser pre-diabéticos, b) un test de tolerancia a la glucosa (GTT), y c) un test de tolerancia a la insulina (ITT). La **Fig. 2** muestra los niveles plasmáticos de las hormonas insulina, glucagón y leptina de una de las tandas de animales, representativa de las diferentes tandas.

4.1.1 Curva de la ganancia de peso de animales en relación a la dieta consumida

En la **Fig. 1A** se muestra la evolución del peso de dos grupos de ratones C57BL/6J respecto al tiempo durante 16-18 semanas alimentados con dos dietas diferentes: dieta con un 10% en grasa y dieta con un 45% en grasa. A la derecha se muestra el cálculo del área bajo la curva (AUC).

Como puede apreciarse en la mencionada **Fig. 1A**, todos los animales ganaron peso de manera más o menos similar hasta las 8 semanas (60 días) aproximadamente. En ese momento, se produce un cambio drástico de la pendiente de la curva de incremento de peso del grupo de ratones que consumieron la dieta enriquecida en grasa al 45% con respecto al grupo control. A partir de la semana 9 la diferencia de peso entre ambos grupos es estadísticamente significativa, y puede decirse que los animales alimentados con dieta al 45% en grasa son obesos con respecto a los animales controles. Tras el sacrificio, se pudo comprobar que este sobrepeso se debía a una mayor cantidad de tejido adiposo visceral (datos no mostrados). Como se indicará a continuación, estos animales muestran también características típicas de pre-diabetes a partir de las 8 semanas de consumo de la dieta alta en grasa.

4.1.2 Test de tolerancia a la glucosa (GTT) y test de tolerancia a la insulina (ITT)

Con el fin de verificar la existencia de alteraciones en la homeostasis de la glucosa en nuestro modelo de animal obeso, se realizaron mediciones de la glucosa basal en ayunas, un test intraperitoneal de tolerancia a la glucosa (GTT) (**Fig. 1B**) y un test de tolerancia a la insulina (ITT) (**Fig. 1C**) tras ayuno nocturno de los animales.

Los animales alimentados con una dieta alta en grasa mostraron una tendencia a tener una glucemia en ayunas incrementada con respecto a los controles, aunque esta diferencia no llegó a ser significativa (controles: 112 ± 6 mg/dl; dieta 45% grasa: 128 ± 7 mg/dl; $n=29-31$ cada grupo; $p=0.0703$, test t-Student). La **Fig. 1B**, muestra el perfil de los valores de glucosa en sangre (mg/dl) obtenidos respecto al tiempo (min) tras una inyección intraperitoneal de glucosa (2g/kg de peso corporal) a animales ayunados después de 8 semanas en dieta. A la derecha de la **Fig. 1B** se representan el cálculo de las áreas bajo la curva. Las muestras de sangre fueron obtenidas de la cola de los animales y se midieron empleando un glucómetro convencional. Como puede observarse, hasta los 30min los niveles de glucosa aumentaron exponencialmente de manera muy similar en las muestras de sangre procedentes de los grupos de animales alimentados con cada una de las dos dietas ensayadas. A partir de ese momento, los niveles sanguíneos de glucosa van descendiendo en las muestras procedentes de animales alimentados con dieta control, mientras que en los procedentes de animales alimentados con dieta al 45% en grasa siguen subiendo, alcanzando valores máximos a los 45min. A partir de ese momento, los niveles de glucosa comienzan a descender hasta alcanzar, a los 120min, valores más próximos a los de los animales control. Por tanto, puede afirmarse que los animales alimentados con dieta al 45% en grasa muestran intolerancia a la glucosa, un rasgo típico de la pre-diabetes. La **Fig. 1C** muestra los valores de glucosa en sangre (mg/dl) respecto al tiempo (min) tras una inyección intraperitoneal de insulina (0.75U/kg de peso corporal) a animales ayunados después de 11 semanas en dieta, mediante una metodología de trabajo similar a la del GTT. La gráfica de la derecha representa el cálculo del área bajo la curva. Se puede observar cómo los valores sanguíneos de glucosa correspondientes a los ratones que fueron alimentados con dieta 45% en grasa se mantienen más elevados en el tiempo que los correspondientes a los animales alimentados con la dieta control. Este hecho indicaría que los ratones que consumieron la dieta con mayor contenido graso tienen menor capacidad de respuesta a la insulina endógena; esto es, que son más resistentes a la acción aclaradora de glucosa llevada a cabo por la insulina. Por tanto, podemos afirmar, también, que los animales alimentados con la dieta al 45% en grasa son resistentes a la insulina, otro rasgo que es típico de la pre-diabetes.

4.1.3 Niveles plasmáticos de glucosa y de las hormonas insulina, glucagón y leptina

Los niveles de glucosa sanguínea, medidos mediante un glucómetro a partir de sangre extraída de la cola en las semanas 8, 11 y previamente al sacrificio, mostraron un incremento en los ratones que habían consumido la dieta al 45% en grasa (semana 11: controles, 123 ± 4 mg/dl; 45% dieta grasa, 140 ± 5 mg/dl; $p < 0.05$, test *t* Student). Por tanto, podríamos decir, igualmente, que los ratones alimentados con dieta al 45% en grasa son hiperglucémicos con respecto a los animales controles, aunque el nivel de hiperglucemia es leve.

Los valores plasmáticos de las hormonas insulina, glucagón y leptina en el momento del sacrificio se muestran en la **Fig. 2**. Como puede observarse, los ratones que consumieron la dieta al 45% en grasa mostraron valores de concentración plasmática de las hormonas insulina (**Fig. 2A**) y leptina (**Fig. 2B**) significativamente más elevados que los del grupo control. Por tanto, los animales alimentados con la dieta al 45% en grasa son hiperinsulinémicos e hiperleptinémicos, todo ello características también típicas de estadios tempranos de diabetes tipo 2 o pre-diabetes. Por el contrario, los niveles de glucagón (**Fig. 2C**) mostraron un incremento en los animales con dieta al 45% en grasa aunque no llegó a alcanzar la significación estadística.

En conjunto, podemos decir que nuestro modelo animal de obesidad y pre-diabetes inducida por dieta, al menos desde el punto de vista bioquímico y metabólico se asemeja enormemente a la situación de pre-diabetes humana; donde el islote pancreático se ve forzado a producir de manera continua insulina sin que por ello, pueda conseguir mantener la normogluemia.

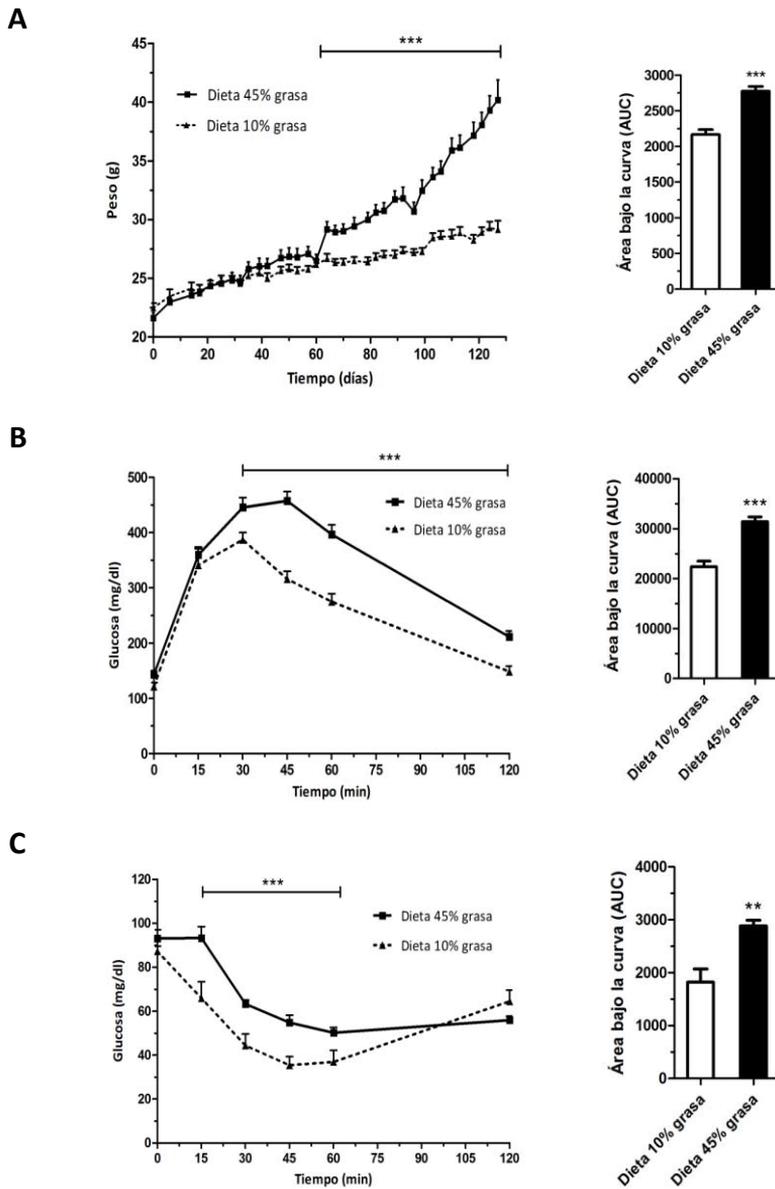


Figura 1. Ganancia de peso, tolerancia a glucosa y tolerancia a insulina en ratones C57BL/6J sometidos a dieta control (10% en grasa) o alta en grasa (45%). A) Curva de ganancia de peso, B) Test de tolerancia a glucosa tras 8 semanas de consumo de cada dieta y C) Test de tolerancia a insulina a las 11 semanas de consumo de cada dieta. Dieta 45% en grasa (cuadrados, línea continua), dieta control (triángulos, línea discontinua). Las líneas horizontales denotan diferencias estadísticamente significativas, N=10 animales cada grupo, (***) $p < 0.001$, ANOVA de medidas repetidas. A la derecha de cada gráfica se muestra las correspondientes áreas bajo la curva (AUC). (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$, prueba t-Student.

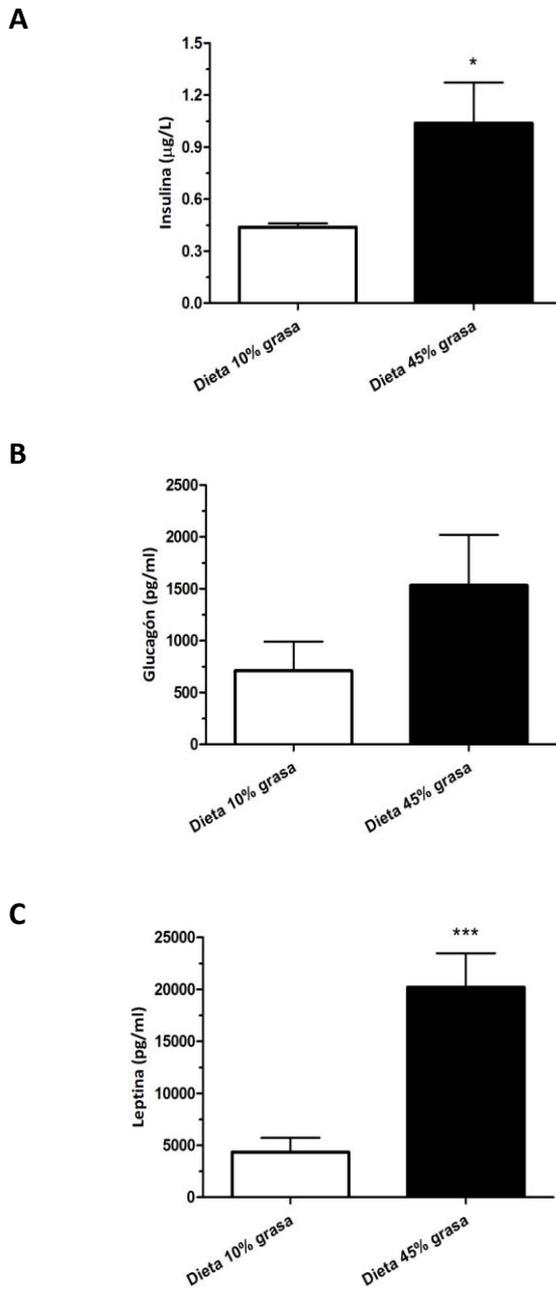


Figura 2. Concentraciones plasmáticas de insulina, glucagón y leptina en ratones sanos y pre-diabéticos. Ratones C57BL/6J fueron alimentados durante 18 semanas con dieta control (10% grasa) o dieta al 45% grasa. (*) $p < 0.05$, (***) $p < 0.001$, $N = 8$ ratones en cada grupo, prueba t-Student.

4.2 MODULACIÓN POR LOS RECEPTORES CB1 Y GPR55 DE LA SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR MEDIADA POR GLUCOSA EN ISLOTES PANCREÁTICOS DE RATONES Y HUMANOS

4.2.1 Análisis de la expresión de los receptores CB1 y GPR55, mediante Western blot, en islotes pancreáticos y otros tejidos de ratones C57BL/6J

Como puede observarse en la **Fig. 3A**, el receptor cannabinoide CB1 se expresa en islotes pancreáticos aislados de ratones C57BL/6J, como ya previamente había sido descrito por nuestro grupo y por otros autores, así como en otros tejidos como bazo, cerebelo, cerebro ó hígado. Dado que el tamaño de la banda obtenida para CB1 (76kDa) fue superior a los 60kDa esperados, se comprobó la especificidad del anticuerpo primario realizando un Western blot donde éste fue preincubado con un péptido que lo bloquea. Como puede observarse en la parte derecha de la **figura 3A**, la tinción puede considerarse específica, ya que el péptido bloqueante del anti-CB1 utilizado previene por completo la aparición de la banda correspondiente a CB1.

Por su parte, el receptor GPR55 muestra una intensa expresión en islotes pancreáticos y tejidos como cerebro o hígado (**Fig. 3B**). La presencia de la banda a la altura de la masa molecular esperada sugiere que esta inmunotinción es específica.

4.2.2 Modulación de la expresión del receptor cannabinoide CB1 en islotes pancreáticos de animales pre-diabéticos

La **Fig. 3C** muestra imágenes del resultado de los Western blot revelados para el receptor cannabinoide CB1 a partir de extractos proteicos obtenidos de islotes pancreáticos de ratones sanos (alimentados con una dieta estándar al 10% en grasa) y ratones pre-diabéticos (alimentados con una dieta al 45% en grasa). Como proteína normalizadora de la carga se empleó la β -actina. En la **Fig. 3D** se muestra la representación gráfica en tantos por ciento (%) de la relación CB1/ β -actina analizada por densitometría a partir de las bandas obtenidas en los Western blot. Los resultados se han referido a los obtenidos con los animales controles (alimentados con una dieta al 10% en grasa), que los consideramos el 100%. Como puede observarse, los animales pre-diabéticos tienen un incremento de un 33% en la expresión del receptor CB1.

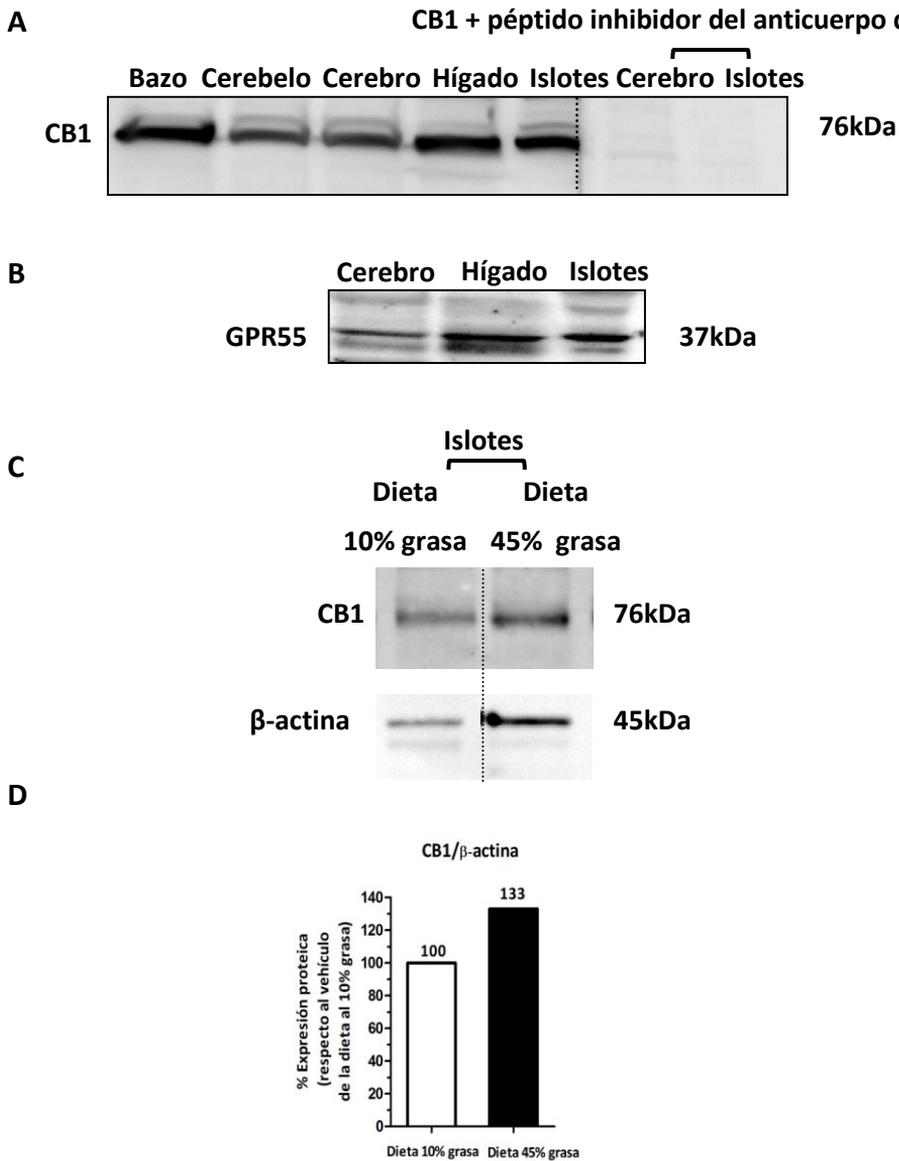


Figura 3. Expresión de CB1 y GPR55 en diferentes tejidos de ratones C57BL/6J. A) Determinación mediante Western blot de CB1 en bazo, cerebelo, cerebro, hígado e islotes pancreáticos de ratones controles (dieta 10% grasa). Las 2 calles de la derecha muestran el control negativo de pre-incubación del anticuerpo primario con el péptido inmunizante en extractos de cerebro e islotes. B) Determinación mediante Western blot de GPR55 en cerebro, hígado e islotes de ratones controles. C) Western blot de CB1 en islotes de ratones sanos controles y pre-diabéticos (dieta 45% grasa). D) Cuantificación relativa por densitometría de la relación CB1/ β -actina en islotes de animales sanos y pre-diabéticos del Western blot del apartado C. El nivel de expresión de las proteínas analizadas obtenido con ratones sanos se considera 100%.

4.2.3 Análisis mediante Western blot de la vía de señalización Akt/PKB en islotes pancreáticos de ratones C57BL/6J, CD1 y humanos

4.2.3.1 Vía de señalización Akt/PKB en islotes pancreáticos de ratones

La **Fig. 4A** muestra imágenes representativas de Western blot (izquierda) de las proteínas Akt total (Akt) y su forma fosforilada (P-Akt), en extractos proteicos de islotes pancreáticos de ratones sanos y ratones pre-diabéticos, y que 15min antes de su sacrificio fueron inyectados, bien con vehículo (0.1% etanol en suero salino) o con rimonabant (0.1mg/kg peso), seguido de una inyección de sobrecarga de glucosa (2g/kg). Arriba a la derecha de la **Fig. 4A**, se muestran en tantos por ciento (%) las relaciones P-Akt/Akt totales obtenidas tras el análisis densitométrico de las bandas obtenidas en de los Western blot. Se puede observar cómo el bloqueo de CB1 inducido por el rimonabant disminuye en torno a un 30% la fosforilación de Akt en los ratones controles ($p < 0.05$, ANOVA de dos vías), no observándose cambios en los animales pre-diabéticos. Asimismo, la fosforilación de Akt parece ligeramente disminuida (en torno al 15%) en los islotes procedentes de animales pre-diabéticos (Veh) al compararla con la de los animales sanos (Veh), aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa. En la **Fig. 4B** (izquierda) se muestran imágenes de Western blot revelados para las proteínas Akt total, P-Akt y β -actina en islotes pancreáticos procedentes de ratones CD1 sanos, tratados durante 30min *in vitro* con LH-21 (0.1 μ M), antagonista del receptor cannabinoide CB1, ó con Veh (DMSO 0.04%). Los experimentos se realizaron en condiciones de alta (25mM) y media glucosa (5.6mM). A la derecha de la **Fig. 4B** se muestran, también, los valores en % de las relaciones P-Akt/Akt total, obtenidos tras el análisis densitométrico de las bandas obtenidas en los Western blot. Tras el análisis de las imágenes, puede comprobarse que el tratamiento con LH-21 disminuyó la fosforilación de Akt a las dos concentraciones de glucosa empleadas. En la **Fig. 4C** se muestran imágenes de Western blot (izquierda) para las proteínas Akt total, P-Akt, y β -actina expresadas en islotes pancreáticos de ratones C57BL/6J sanos tratados durante 30min *in vitro* con Abn-CBD (a 0.1, 1 y 10 μ M), agonista del receptor GPR55, o con Veh (DMSO 0.007%). Los experimentos se realizaron en condiciones de alta glucosa (25mM). A la derecha de la **Fig. 4C**, se muestran, también, los valores en % de la relación entre las formas fosforiladas y totales de las mencionadas proteínas Akt, obtenidos tras el análisis densitométrico de las bandas referido a los controles (islotes tratados sólo con vehículo). Como puede observarse, el tratamiento de los islotes con Abn-CBD, disminuyó de manera dosis dependiente la fosforilación de Akt, llegando hasta el 33% de disminución cuando se empleó la concentración más alta ensayada (10 μ M).

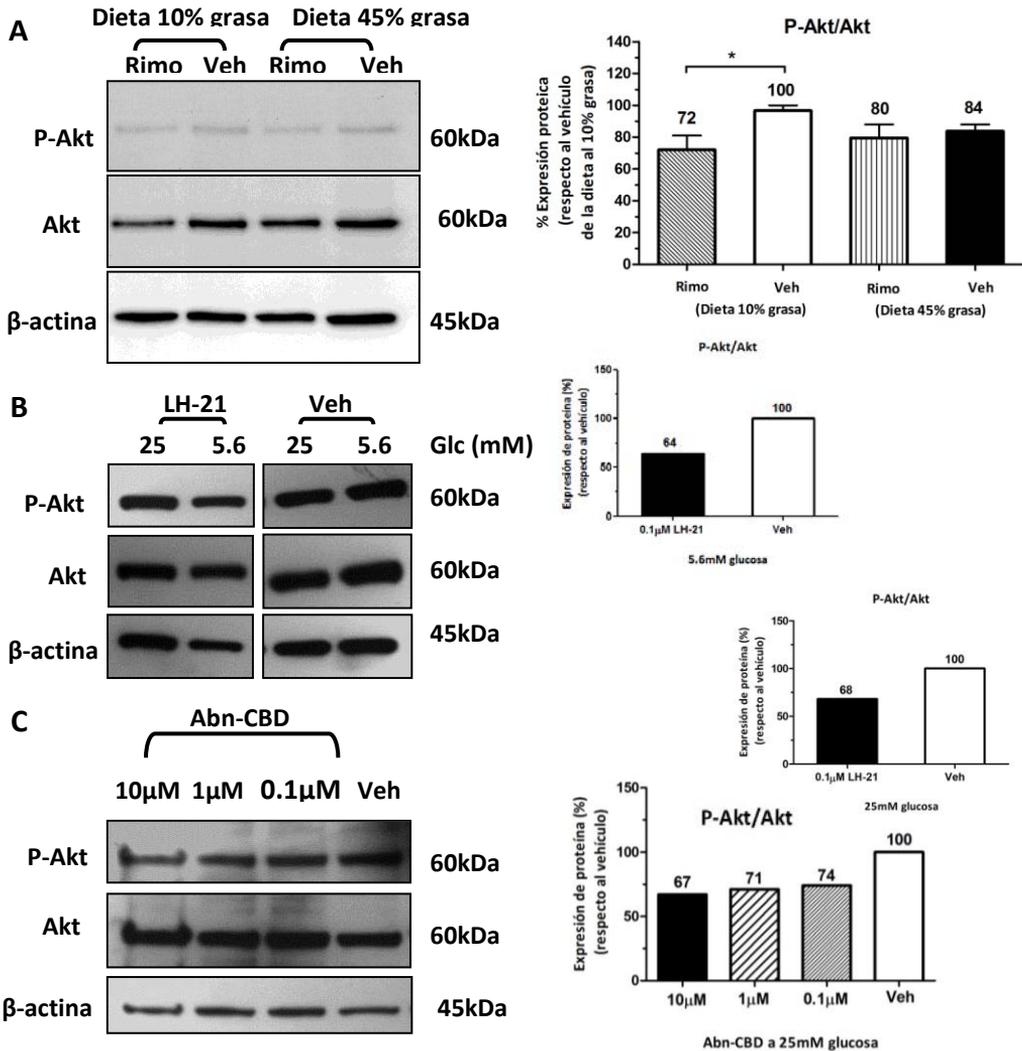


Figura 4. Estudio de la fosforilación de la proteína Akt en islotes pancreáticos aislados de ratones tratados con los ligandos cannabinoides rimonabant, LH-21 y Abn-CBD. A) Determinación mediante Western blot de las proteínas Akt fosforilada (P-Akt) y total (Akt) en islotes pancreáticos aislados de 2 grupos de ratones C57BL/6J alimentados con dieta 10% grasa (control) y dieta 45% grasa y tratados con rimonabant (Rimo) (0.1mg/Kg) ó con vehículo (Veh) durante 15min, seguido de una sobrecarga intraperitoneal de glucosa (Glc) y sacrificio a los 10min; (*) $p < 0.05$ Rimo vs. Veh, test t Student, (N=3). B) Determinación mediante Western blot de las proteínas P-Akt y Akt en islotes pancreáticos aislados de ratones CD-1 tratados *in vitro* durante 30min con LH-21 (0.1μM) ó con Veh, a 5.6mM y a 25mM de Glc. C) Determinación mediante Western blot de las proteínas P-Akt y Akt en islotes pancreáticos aislados de ratones C57BL/6J tratados durante 30min con diferentes concentraciones del agonista del receptor GPR55, Abn-CBD en alta Glc (25mM). La β-actina se empleó como control de carga. A la derecha de los paneles A), B) y C) se muestran las cuantificaciones densitométricas de los resultados obtenidos para las relaciones P-Akt/Akt referidos a los valores obtenidos cuando los islotes son tratados sólo con Veh, considerados 100%.

4.2.3.2 Vía de señalización AKT/PKB en islotes pancreáticos humanos

La **Fig. 5A** muestra imágenes de Western blot de las proteínas AKT total (AKT), su forma fosforilada (P-AKT), y β -actina expresadas en islotes pancreáticos humanos, tratados durante 30min *in vitro* con Abn-CBD (10 μ M), LH-21 (0.1 μ M) ó con vehículo (DMSO 0.04%). Los experimentos se realizaron en condiciones de alta glucosa (25mM) y media glucosa (5.6mM). En la **Fig. 5B** se muestran los valores en % de las relaciones P-AKT/AKT total, resultado del análisis densitométrico de las bandas de los Western blot, referidos a los islotes control tratados sólo con vehículo y que consideramos el 100%.

Como puede verse en la **Fig. 5B**, el tratamiento de islotes humanos, bien con el agonista del receptor GPR55 Abn-CBD, ó con el antagonista del receptor cannabinoide CB1 LH-21, modificó la fosforilación de la proteína AKT. Así, el tratamiento de los islotes con LH-21 hizo incrementar la fosforilación de esta proteína hasta un 51%, independientemente del nivel de glucosa utilizado en el medio. Al igual que LH-21, el tratamiento con Abn-CBD aumentó el nivel de fosforilación de AKT, si bien lo hizo en menor proporción a 25mM (16%) que a 5.6mM de glucosa (28%).

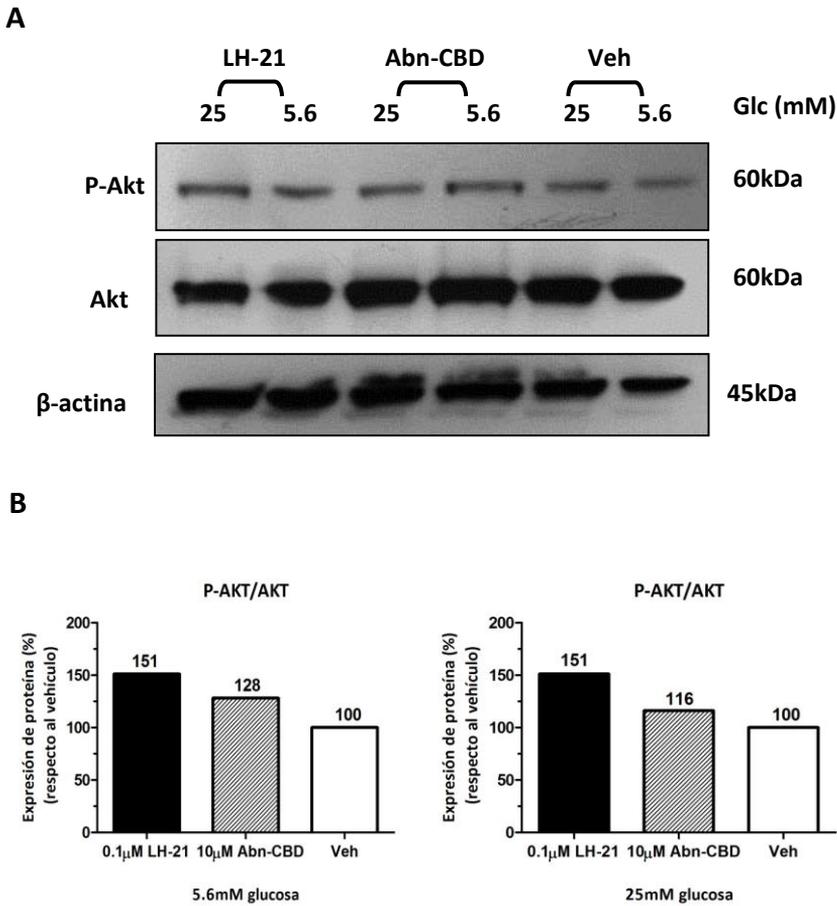


Figura 5. Estudio de la fosforilación de la proteína AKT en islotes pancreáticos humanos, tratados con los ligandos cannabinoides Abn-CBD ó LH-21. A) Determinación mediante Western blot de las proteínas AKT fosforilada (P-AKT) y total (AKT) en islotes pancreáticos humanos tratados durante 30min con Abn-CBD (10µM) ó LH-21 (0.1µM) en condiciones de alta (25mM) o media glucosa (Glc) (5.6mM). Se empleó como proteína normalizadora de la carga, β-actina. B) Cuantificación densitométrica de las relaciones P-AKT/AKT calculadas a partir de los resultados obtenidos en A) referidas a los valores de las relaciones P-AKT/AKT obtenidos cuando los islotes se trataron sólo con vehículo (100%).

4.2.4 Análisis mediante Western blot de la vía de señalización cAMP/CREB en islotes pancreáticos de ratones C57BL/6J, CD1 y humanos

4.2.4.1 Vía de señalización cAMP/CREB en islotes pancreáticos de ratones

La **Fig. 6A** (izquierda) muestra imágenes representativas de Western blot para la proteína total del factor de transcripción CREB (CREB), su forma fosforilada (P-CREB) y β -actina, en extractos proteicos obtenidos de islotes pancreáticos de ratones sanos y pre-diabéticos y que, antes de su sacrificio, fueron inyectados, bien con vehículo (0.1% etanol en suero salino) o con rimonabant (0.1mg/kg peso), antagonista del receptor cannabinoide CB1, seguido de una inyección de sobrecarga de glucosa. A la derecha de la **Fig. 6A** se muestran los valores en tanto por ciento (%) de la relación P-CREB/CREB, obtenidos tras análisis densitométrico de las bandas de los Western blot. Se puede observar cómo el tratamiento con Rimo incrementa la fosforilación de CREB un 33% en los islotes procedentes de los ratones sanos, aunque no de manera estadísticamente significativa (ANOVA de dos vías). Sin embargo, el tratamiento con rimonabant de animales alimentados con dieta al 45% grasa no parece tener efecto alguno sobre los niveles de fosforilación de CREB. Por otro lado, los niveles de fosforilación de CREB en islotes procedentes de animales pre-diabéticos (Veh) parecen estar ligeramente incrementados con respecto a los islotes tratados con vehículo de los animales controles (en torno a un 15%), aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa. En la **Fig. 6B** (izquierda) se muestran imágenes de Western blot en extractos proteicos de islotes pancreáticos de ratones CD1 para las proteínas CREB en su forma total y fosforilada y para β -actina; los islotes fueron tratados *in vitro* durante 30min con LH-21 (0.1 μ M), antagonista del receptor cannabinoide CB1, o con Veh (DMSO 0.04%). Los experimentos se realizaron en condiciones de alta (25mM) y media glucosa (5.6mM). A la derecha de la **Fig. 6B** se muestran los valores en % de la relación P-CREB/CREB total, obtenidos tras el análisis densitométrico de las bandas de los Western blot. Puede comprobarse que el tratamiento con LH-21 aumentó la fosforilación de CREB en torno al 20% en condiciones de alta glucosa, y la disminuyó en torno al 35% a 5.6mM de glucosa. En la **Fig. 6C** (izquierda) se muestran imágenes de Western blot para las proteínas del factor de transcripción CREB, totales y fosforiladas, y β -actina expresadas en islotes pancreáticos tratados *in vitro* durante 30min con Abn-CBD, agonista del receptor GPR55 (a concentraciones 0.1, 1 y 10 μ M) o con vehículo (DMSO 0.007%), procedentes de ratones C57BL/6J. Los experimentos se realizaron en condiciones de alta glucosa (25mM). A la derecha de los Western-blot, se muestran los valores en % de la relación entre las formas fosforiladas y totales de CREB, obtenidos tras el análisis

densitométrico de las bandas referidos a los resultados obtenidos con los islotes controles. Como se puede observar, el tratamiento de los islotes con Abn-CBD, incrementó la fosforilación de CREB en un 30%, si bien, este incremento sólo se observó a la mayor de las concentraciones de Abn-CBD ensayadas (10 μ M), no observándose cambios respecto al control a concentraciones inferiores.

4.2.4.2 Vía de señalización ϵ AMP/CREB en islotes pancreáticos humanos

La **Fig. 7A** muestra imágenes de Western blot para las proteínas CREB total, P-CREB y β -actina, expresadas en islotes pancreáticos humanos tratados *in vitro* durante 30min con Abn-CBD (10 μ M), LH-21 (0.1 μ M) ó con vehículo (DMSO 0.04%). Los experimentos se realizaron en condiciones de alta glucosa (25mM) y media glucosa (5.6mM). En la **Fig. 7B** se muestra la representación gráfica de los cocientes P-CREB/CREB total, referidos a los valores obtenidos con los islotes incubados con vehículo (100%), tras el análisis densitométrico de las bandas de los Western blot. Como puede observarse, el tratamiento de los islotes humanos, bien con el agonista del receptor GPR55 Abn-CBD, ó con LH-21, antagonista del receptor cannabinoide CB1, no parecen alterar la fosforilación del factor de transcripción CREB, tanto a 5.6mM como a 25mM de glucosa.

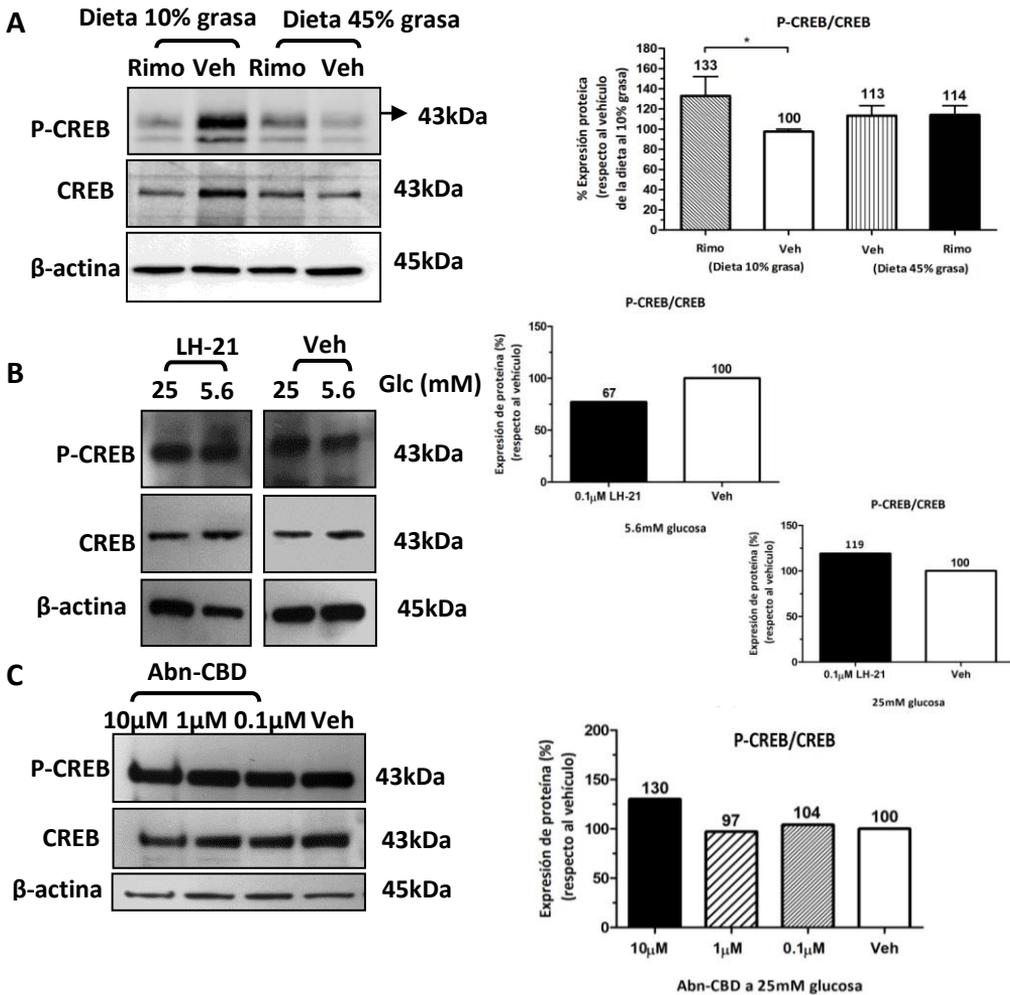


Figura 6. Estudio de la fosforilación del factor de transcripción CREB en islotes pancreáticos aislados de ratones tratados con los ligandos cannabinoides rimonabant, LH-21 y Abn-CBD. A) Determinación mediante Western blot de las proteínas CREB fosforilada (P-CREB) y total (CREB) en islotes pancreáticos aislados de 2 grupos de ratones C57BL/6J alimentados con dieta 10% grasa (control) y dieta 45% grasa y tratados con rimonabant (Rimo) (0.1mg/Kg) ó con vehículo (Veh) durante 15min, seguido de una sobrecarga intraperitoneal de glucosa (Glc) y sacrificio a los 10min; (*) $p < 0.05$ Rimo vs Veh, test t Student, (N=3). B) Determinación mediante Western blot de las proteínas P-CREB y CREB en islotes pancreáticos aislados de ratones CD-1 tratados *in vitro* durante 30min con LH-21 (0.1μM) ó con Veh, a 5.6mM y a 25mM de Glc. C) Determinación mediante Western blot de las proteínas P-CREB y CREB en islotes pancreáticos aislados de ratones C57BL/6J tratados durante 30min con diferentes concentraciones del agonista del receptor GPR55, Abn-CBD en alta Glc (25mM). La β-actina se empleó como control de carga. A la derecha de los paneles A), B) y C) se muestran las cuantificaciones densitométricas de los resultados obtenidos para las relaciones P-CREB/CREB referidos a los valores cuando los islotes son tratados sólo con Veh, considerados 100%.

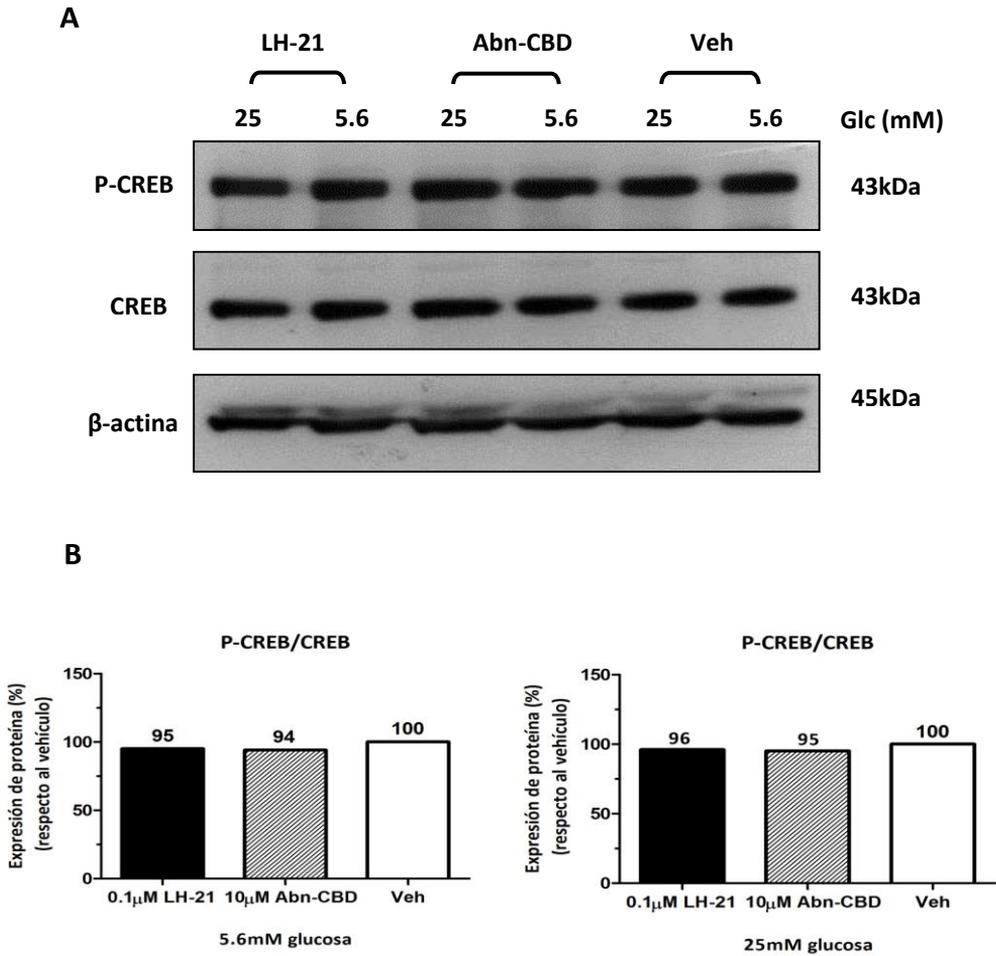


Figura 7. Estudio de la fosforilación del factor de transcripción CREB en islotes pancreáticos humanos, tratados con los ligandos cannabinoides Abn-CBD ó LH-21. A) Determinación mediante Western blot de las proteínas CREB fosforilada (P-CREB) y total (CREB) en islotes pancreáticos humanos tratados durante 30min con Abn-CBD (10 μ M) ó LH-21 (0.1 μ M) en condiciones de alta (25mM) o media glucosa (Glc) (5.6mM). Se empleó como proteína normalizadora de la carga, β -actina. B) Cuantificación densitométrica de las relaciones P-CREB/CREB calculadas a partir de los resultados obtenidos en A) referidas a los valores de las relaciones P-CREB/CREB obtenidos cuando los islotes se trataron sólo con vehículo (100%).

4.2.5 Análisis mediante Western blot de la vía de señalización AMPK en islotes pancreáticos de ratones C57BL/6J, CD1 y humanos

4.2.5.1 Vía de señalización AMPK en islotes pancreáticos de ratones

La **Fig. 8A** (izquierda) muestra imágenes representativas de Western blot para las proteínas AMPK total (AMPK), su forma fosforilada (P-AMPK) y β -actina, en extractos proteicos obtenidos de islotes pancreáticos de ratones sanos y ratones pre-diabéticos y que, antes de su sacrificio, fueron inyectados, bien con vehículo (0.1% etanol en suero salino) o con rimonabant (0.1mg/kg peso), antagonista del receptor cannabinoide CB1, seguido de una inyección de sobrecarga de glucosa. En la **Fig. 8A** (derecha) se muestran los valores en tanto por ciento (%) de la relación P-AMPK/AMPK total, obtenidos tras el análisis densitométrico de las bandas de los Western blot. Se puede observar cómo el tratamiento con rimonabant incrementa la fosforilación de AMPK en torno al 70% en los islotes procedentes de ratones alimentados con dieta 10% grasa, ($p < 0.05$, ANOVA de dos vías). Sin embargo, no se observa efecto del rimonabant sobre la fosforilación de AMPK en los islotes de animales pre-diabéticos. A su vez, se aprecia un ligero incremento (del 20%) en la fosforilación de AMPK (no significativo) en los islotes de animales pre-diabéticos inyectados con vehículo con respecto a los animales controles también inyectados con vehículo. En la **Fig. 8B** (izquierda) se muestran imágenes de Western blot para la proteína AMPK, en su forma total y fosforilada, así como β -actina de islotes pancreáticos procedentes de ratones CD1, tratados *in vitro* durante 30min con LH-21 (0.1 μ M), antagonista del receptor cannabinoide CB1, ó con vehículo (DMSO 0.04%). Los experimentos se realizaron en condiciones de alta (25mM) y media glucosa (5.6mM). A la derecha se muestran los valores en tanto por ciento (%), respecto del vehículo, del cociente entre las formas fosforiladas y total de la mencionada proteína AMPK, obtenidos tras el análisis densitométrico de las bandas de los Western blot. Puede comprobarse que el tratamiento con LH-21 disminuyó en aproximadamente un 25% la fosforilación de AMPK tanto en condiciones de 5.6mM como de 25mM de glucosa. En la **Fig. 8C** (izquierda) se muestran imágenes de Western blot para las proteínas AMPK, P-AMPK, y β -actina expresadas en islotes pancreáticos procedentes de ratones C57BL/6J WT, tratados *in vitro* durante 30min con Abn-CBD, agonista del receptor GPR55 (a concentraciones 0.1, 1 y 10 μ M o con vehículo (DMSO 0.007%). Los experimentos se realizaron en condiciones de alta glucosa (25mM). A la derecha de los Western blot se muestran las representaciones gráficas referidas a los valores obtenidos cuando se empleó vehículo (100%), correspondientes a la cuantificación por densitometría de las bandas. Como se puede observar, el tratamiento de los

islotes con Abn-CBD, aumentó de manera dosis dependiente la fosforilación de AMPK, llegando hasta alrededor de un 35% de incremento respecto del control para la dosis de 10 μ M de Abn-CBD.

4.2.5.2 Vía de señalización AMPK en islotes pancreáticos humanos

La **Fig. 9A** muestra imágenes de Western blot para las proteínas AMPK total, P-AMPK y β -actina, expresadas en islotes pancreáticos humanos, tratados *in vitro* durante 30min con Abn-CBD (10 μ M), LH-21 (0.1 μ M) o con vehículo (DMSO 0.04%). Los experimentos se realizaron en condiciones de alta glucosa (25mM) y media glucosa (5.6mM). En la **Fig. 9B** se muestran los valores en % de los cocientes AMPK fosforilada/AMPK total resultado del análisis densitométrico de las bandas, referidos a los islotes control tratados sólo con vehículo y que consideramos el 100%. Como puede observarse, el tratamiento de islotes humanos, ya sea con el agonista del receptor GPR55, Abn-CBD, o con el antagonista del receptor cannabinoide CB1, LH-21, no parece alterar la fosforilación de la proteína AMPK, ni a 5.6mM ni a 25mM de glucosa.

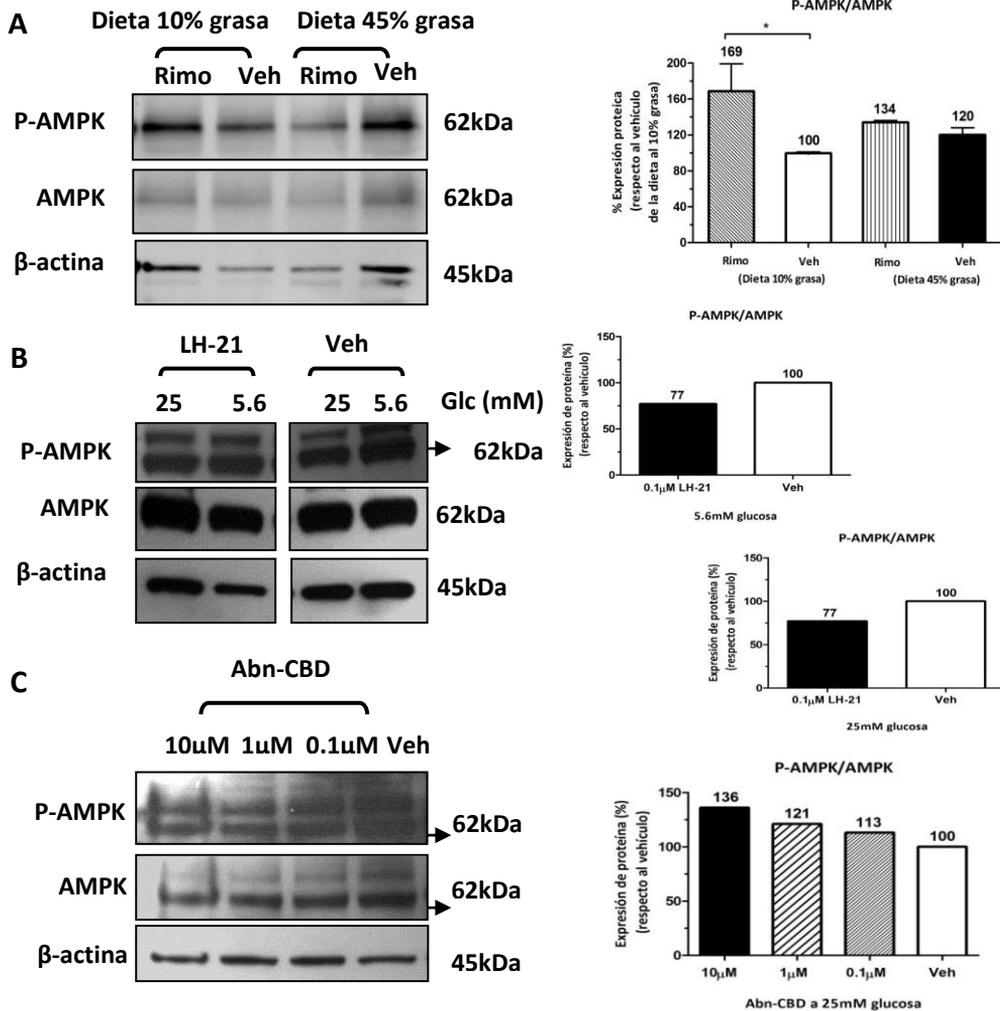


Figura 8. Estudio de la fosforilación de la proteína AMPK en islotes pancreáticos aislados de ratones tratados con los ligandos cannabinoides rimonabant, LH-21 y Abn-CBD. A) Determinación mediante Western blot de las proteínas AMPK fosforilada (P-AMPK) y total (AMPK) en islotes pancreáticos aislados de 2 grupos de ratones C57BL/6J alimentados con dieta 10% grasa (control) y dieta 45% grasa y tratados con rimonabant (Rimo) (0.1mg/Kg) ó con vehículo (Veh) durante 15min, seguido de una sobrecarga intraperitoneal de glucosa (Glc) y sacrificio a los 10min; (*) $p < 0.05$ Rimo vs. Veh, test t Student, (N=3). B) Determinación mediante Western blot de las proteínas P-AMPK y AMPK en islotes pancreáticos aislados de ratones CD-1 tratados *in vitro* durante 30min con LH-21 (0.1μM) ó con Veh, a 5.6mM y a 25mM de Glc. C) Determinación mediante Western blot de las proteínas P-AMPK y AMPK en islotes pancreáticos aislados de ratones C57BL/6J tratados durante 30min con diferentes concentraciones del agonista del receptor GPR55, Abn-CBD en alta Glc (25mM). La β-actina se empleó como control de carga. A la derecha de los paneles A), B) y C) se muestran las cuantificaciones densitométricas de los resultados obtenidos para las relaciones P-AMPK/AMPK referidos a los valores cuando los islotes son tratados sólo con Veh, considerados 100%.

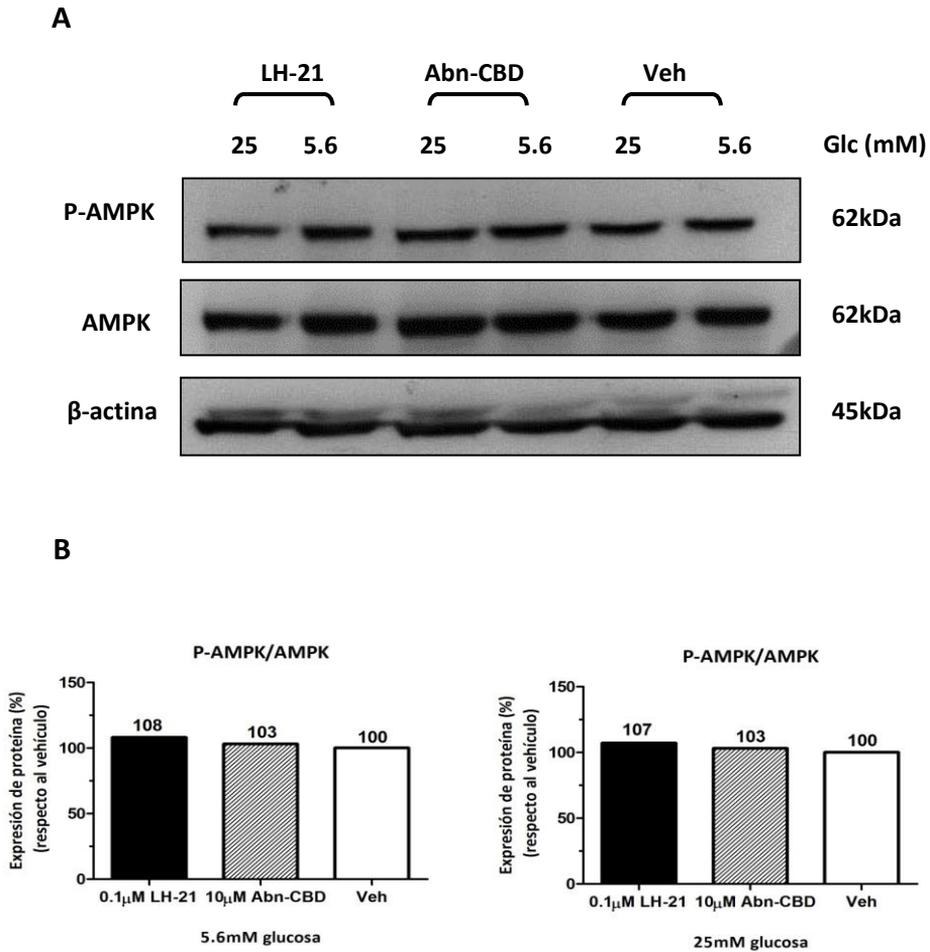


Figura 9. Estudio de la fosforilación de la proteína AMPK en islotes pancreáticos humanos, tratados con los ligandos cannabinoides Abn-CBD ó LH-21. A) Determinación mediante Western blot de las proteínas AMPK fosforilada (P-AMPK) y total (AMPK) en islotes pancreáticos humanos tratados durante 30min con Abn-CBD (10 μ M) ó LH-21 (0.1 μ M) en condiciones de alta (25mM) o media glucosa (Glc) (5.6mM). Se empleó como proteína normalizadora de la carga, β -actina. B) Cuantificación densitométrica de las relaciones P-AMPK/AMPK calculadas a partir de los resultados obtenidos en A) referidas a los valores de las relaciones P-AMPK/AMPK obtenidos cuando los islotes se trataron sólo con vehículo (100%).

4.2.6 Análisis mediante Western blot de la vía de señalización mTORC1 en islotes pancreáticos de ratones C57BL/6J

4.2.6.1 Análisis mediante Western blot de la vía de señalización mTORC1 en islotes pancreáticos de ratones C57BL/6J inyectados con rimonabant

La **Fig. 10A** (izquierda) muestra imágenes de Western blot para la proteína fosforilada p70S6K1 (diana de mTORC1) (P-p70S6K1) y β -actina, en extractos proteicos de islotes pancreáticos de ratones sanos y ratones pre-diabéticos y que, antes de su sacrificio, fueron inyectados, bien con vehículo (0.1% etanol en suero salino) o con rimonabant (0.1mg/kg peso), antagonista del receptor cannabinoide CB1, seguido de una sobrecarga intraperitoneal de glucosa. A la derecha se muestra la representación gráfica del cociente P-p70S6K1/ β -actina, normalizado respecto al grupo vehículo de la dieta al 10%, tras el análisis densitométrico de las bandas de los Western blot. Se puede observar cómo el tratamiento con rimonabant disminuye la fosforilación de p70S6K1 tanto en los islotes procedentes de ratones sanos como de animales pre-diabéticos. Asimismo, en los animales pre-diabéticos inyectados con vehículo se aprecia un ligero incremento (del 20%) de P-p70S6K1 con respecto a los animales controles inyectados con el vehículo.

4.2.6.2 Análisis mediante Western blot de la vía de señalización mTORC1 en islotes pancreáticos de ratones C57BL/6J tratados *in vitro* con rimonabant y/o rapamicina

La **Fig. 10B** (izquierda) muestra imágenes representativas de Western blot para las proteínas, P-p70S6K, p70S6K1 total (p70S6K1) y β -actina, en islotes pancreáticos de ratones C57BL/6J sanos de 10-12 semanas de edad alimentados con una dieta estándar; los islotes fueron tratados *in vitro* durante 15min, bien con vehículo (etanol 0.01% en salino), rimonabant (Rimo) (0.1 μ M), rapamicina (Rapa) (3nM; inhibidor del complejo mTORC1) o la combinación Rimo+ Rapa. A la derecha de la **Fig. 10B** se muestran las cuantificaciones relativas en tanto por ciento (%) de la relación P-p70S6K/p70S6K total/ β -actina, obtenidas tras el análisis densitométrico de las bandas de los Western blot. Se puede observar cómo cuando los islotes se trataron sólo con rimonabant, la fosforilación de p70S6K1 se incrementó notablemente (en torno al 130%) respecto a los controles. Sin embargo, este incremento deja de observarse cuando los islotes se preincubaron con rapamicina antes de la adición del rimonabant, sugiriendo que el efecto de éste es dependiente de que la vía mTORC1 sea funcional.

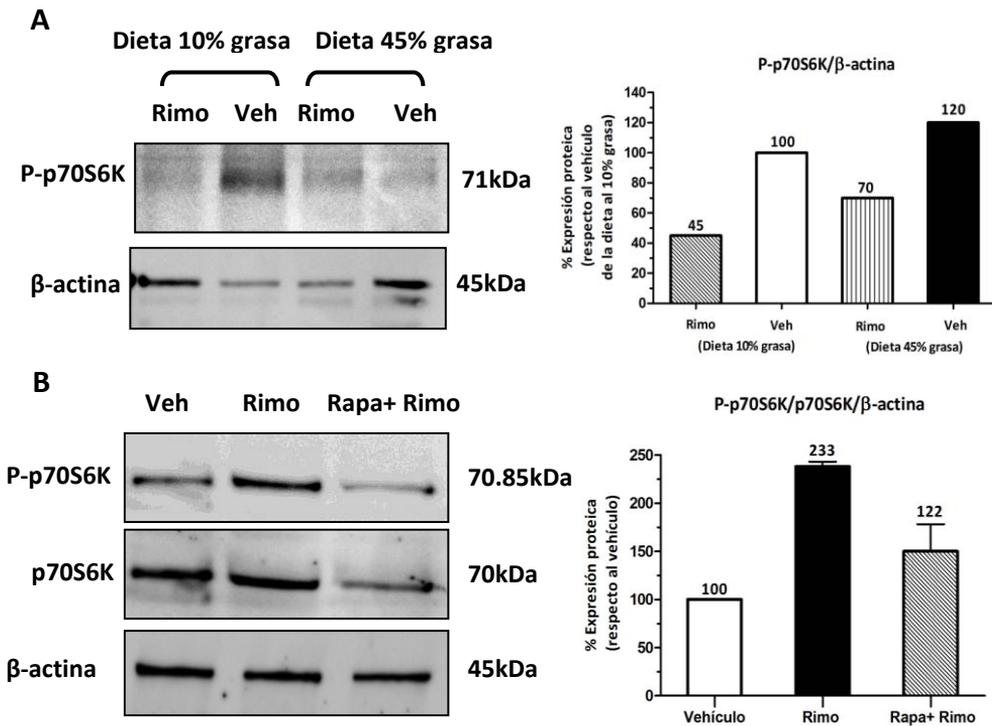


Figura 10. Estudio de la fosforilación de la proteína p70S6K (diana de mTORC1) en islotes pancreáticos de ratones C57BL/6J tratados *in vivo* con Rimonabant (Rimo) ó *in vitro* con Rimo ó Rimo+ Rapamicina (Rapa). A) Determinación mediante Western blot de la proteína fosforilada (P-p70S6K) en islotes pancreáticos aislados de 2 grupos de ratones C57BL/6J alimentados con dieta 10% grasa (control) y dieta 45% grasa y tratados con Rimo (0.1mg/Kg) ó con vehículo (Veh) durante 15min, seguido de una sobrecarga intraperitoneal de glucosa (Glc) y sacrificio a los 10min. A la derecha del panel se muestran los valores en % de la relación P-p70S6K/ β -actina obtenidos tras el análisis densitométrico de las bandas de los Western Blot, referidos a la relación P-p70S6K/ β -actina en islotes de animales alimentados con dieta 10% grasa y tratados sólo con vehículo. B) Determinación mediante Western blot de las proteínas P-p70S6K y p706SK total en islotes pancreáticos aislados de ratones tratados durante 15 minutos con vehículo (etanol 0.01% en salino), Rimo (0.1 μ M), Rapa (3nM) o ambas drogas. A la derecha del panel se muestran los valores en % de la relación P-p70S6K/p70S6K/ β -actina calculados mediante el análisis densitométrico de las bandas de los Western blot, respecto a los obtenidos con islotes control tratados sólo con vehículo. La β -actina se empleó como control de carga en ambos experimentos.

4.3 MODULACIÓN DE LA SEÑAL DE CALCIO INTRACELULAR ($[Ca^{2+}]_i$) DEPENDIENTE DE GLUCOSA POR LOS RECEPTORES CB1 Y GPR55

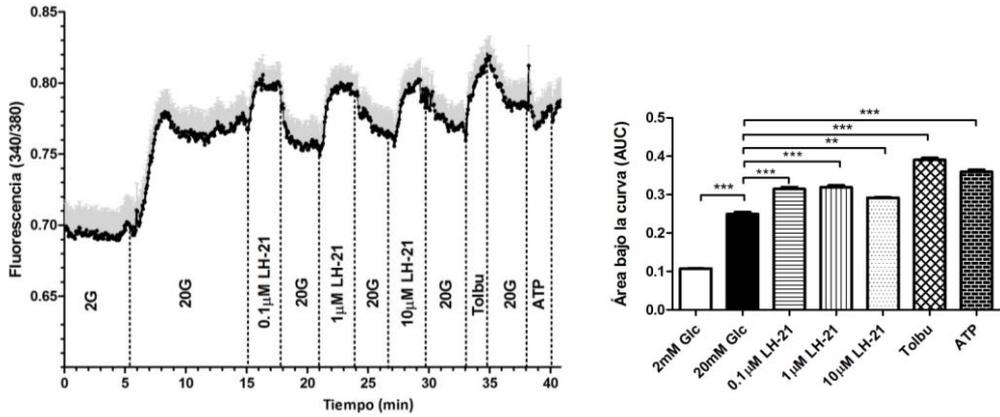
4.3.1 Efectos de LH-21 sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en islotes pancreáticos de ratones C57BL/6J y GPR55^{-/-}

La **Fig. 11A** muestra un registro representativo del calcio intracelular movilizado (véase apartado 3.9 de materiales y métodos), en células β de islotes pancreáticos aislados de ratones C57BL/6J, tras ser tratados con diferentes concentraciones del antagonista cannabinoide LH-21. Puede observarse cómo, las tres dosis de LH-21 ensayadas (0.1, 1 y 10 μ M) incrementaron la $[Ca^{2+}]_i$ en los islotes estimulados con 20mM de glucosa. Por otro lado, en la **Fig. 11B** se muestran los efectos causados por LH-21 sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en islotes obtenidos de ratones C57BL/6J homocigotos nulos para el receptor cannabinoide GPR55 (GPR55^{-/-}). Como puede observarse, en estos últimos islotes, LH-21 causa un efecto estimulador del calcio intracelular similar al encontrado en islotes de ratones C57BL/6J. Como controles positivos de la capacidad de respuesta de los islotes se usaron tolbutamida y ATP que, como se observa en las **Fig. 11A y 11B**, incrementaron notablemente los niveles de $[Ca^{2+}]_i$. La sonda fluorescente para la monitorización del $[Ca^{2+}]_i$ fue Fura-2.

4.3.2 Efectos de Abn-CBD sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en islotes pancreáticos de ratones C57BL/6J y GPR55^{-/-}

La **Fig. 12** muestra registros representativos de la movilización de calcio intracelular en respuesta al agonista del receptor GPR55, Abn-CBD, a 1 y a 10 μ M en células β de islotes de ratones C57BL/6J (A), y en islotes de ratones GPR55^{-/-} (B). Puede observarse que la $[Ca^{2+}]_i$ aumentó de manera notable en respuesta a 10 μ M de Abn-CBD en los islotes de ratones C57BL/6J (GPR55^{+/+} ó WT), pero no en los de ratones GPR55^{-/-}, sugiriendo que el efecto de Abn-CBD es mediado, específicamente, a través del receptor GPR55. Sin embargo, a concentraciones menores (1 μ M), Abn-CBD apenas moviliza calcio intracelular, observándose efectos similares en los islotes procedentes de ratones WT y en los de ratones GPR55^{-/-}. Como control positivo se empleó carbacol (Cch), que incrementó notablemente los niveles de Ca^{2+} intracelular en los islotes de ambos tipos de ratones (WT y GPR55^{-/-}). Los tratamientos con Abn-CBD tuvieron una duración de 4min.

A) Efecto de LH-21 (0.1-10 μ M) en islotes de ratones C57BL/6J



B) Efecto de LH-21 (0.1-10 μ M) en islotes de ratones C57BL/6J GPR55^{-/-}

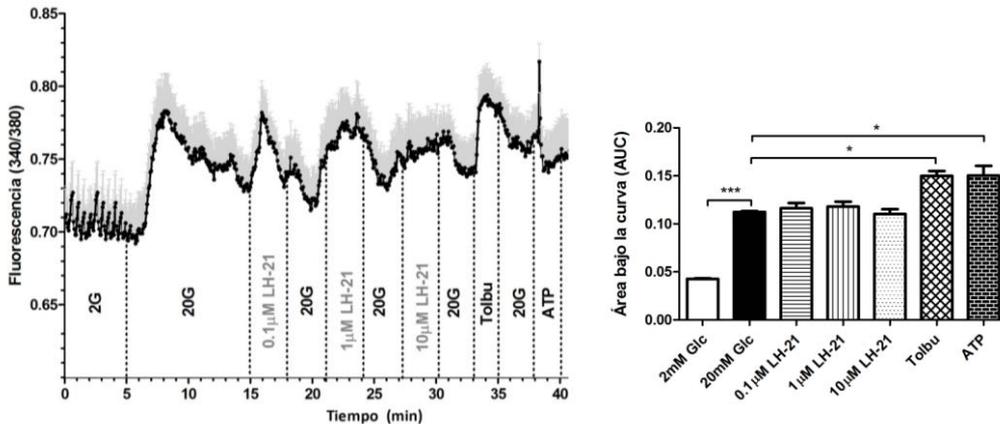
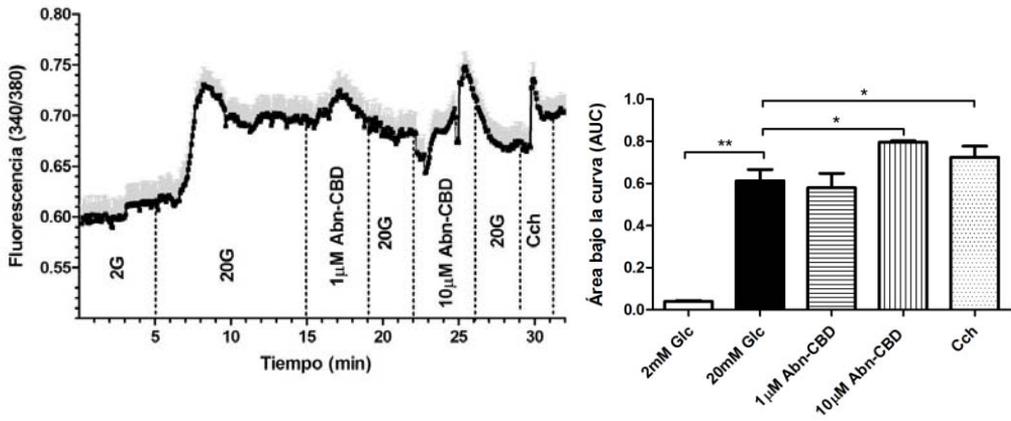


Figura 11. Efecto de LH-21 (0.1, 1 y 10 μ M) sobre la concentración del Ca²⁺ intracelular en las células β de los islotes pancreáticos de ratones. A) Efecto en los islotes de ratones C57BL/6J, B) Efecto en los islotes de ratones C57BL/6J GPR55^{-/-}. El Ca²⁺ intracelular fue monitorizado con la sonda fluorescente Fura-2. 2G= 2mM de glucosa; 20G= 20mM de glucosa; Tolbu= tolbutamida; LH-21 (antagonista del receptor cannabinoide CB1). N=15-20 islotes pancreáticos de cada genotipo. A la derecha de cada gráfica se muestra su correspondiente área bajo la curva (AUC) de ambos grupos de animales. (*) p<0.05, (**) p<0.01, (***) p<0.001, ANOVA de una vía, post-test de Tukey de comparaciones múltiples.

A) Efecto de Abn-CBD (1 y 10 μ M) en islotes de ratones C57BL/6J



B) Efecto de Abn-CBD (1 y 10 μ M) en islotes de ratones C57BL/6J GPR55^{-/-}

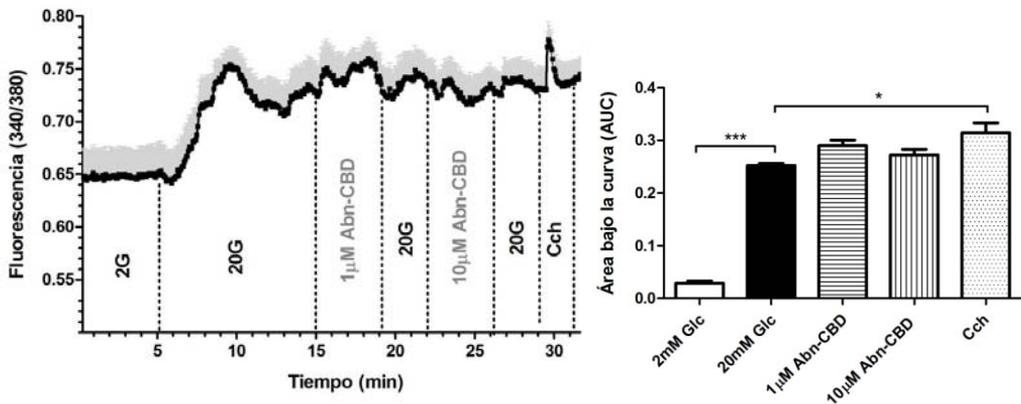


Figura 12. Efecto de Abn-CBD (1 y 10 μ M) sobre la concentración del Ca²⁺ intracelular en las células β de los islotes pancreáticos de ratones. A) Efecto en los islotes de ratones C57BL/6J, B) Efecto en los islotes de ratones C57BL/6J GPR55^{-/-}. El Ca²⁺ intracelular fue monitorizado con la sonda fluorescente Fura-2. 2G= 2mM de glucosa; 20G= 20mM de glucosa; Cch= carbacol; Abn-CBD (agonista del receptor GPR55). N=15-20 islotes pancreáticos. A la derecha de cada gráfica se muestra su correspondiente área bajo la curva (AUC) de ambos grupos de animales. (*) p<0.05, (**) p<0.01, (***) p<0.001, ANOVA de una vía, post-test de Tukey de comparaciones múltiples.

4.3.3 Efectos de LH-21 sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en islotes pancreáticos humanos

En la **Fig. 13**, se muestra un registro representativo de la monitorización de Ca^{2+} intracelular en células β de islotes pancreáticos humanos expuestos a condiciones de baja glucosa (2mM), y alta glucosa (20mM) tratados, con LH-21 a diferentes concentraciones (0.1, 1 y 10 μ M). Como controles positivos se emplearon carbacol y ATP, también a 20mM de glucosa. Como puede observarse, la $[Ca^{2+}]_i$ se incrementa en respuesta a glucosa (20mM) y también tras la adición de LH-21 a 0.1 μ M y 1 μ M. Sin embargo, la dosis más alta ensayada de LH-21 (10 μ M) no produce efecto aparente.

Efecto de LH-21 (0.1-10 μ M) en islotes humanos

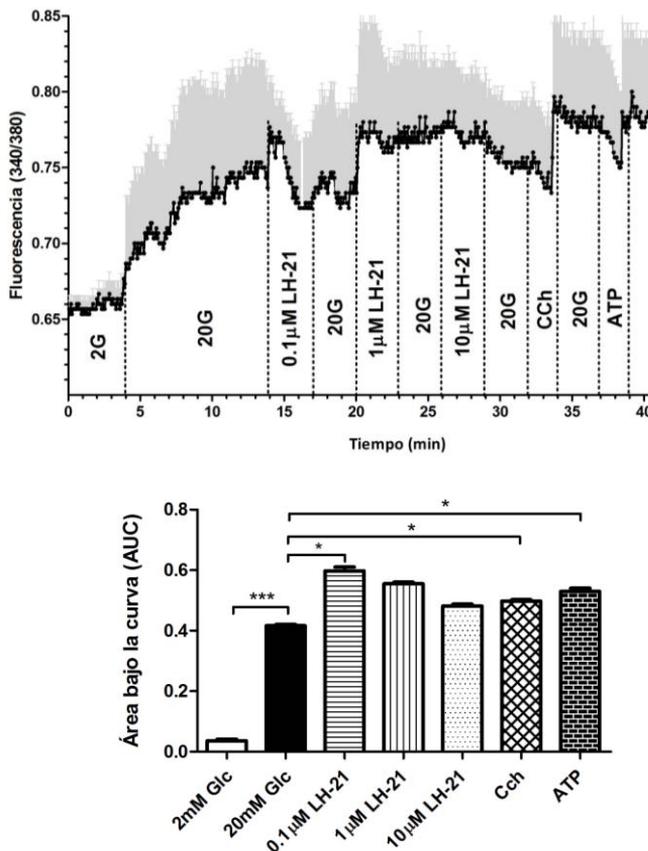


Figura 13. Efecto de LH-21 (0.1, 1 y 10 μ M) sobre la concentración del Ca^{2+} intracelular en las células β de islotes pancreáticos humanos. El Ca^{2+} intracelular fue monitorizado con la sonda fluorescente Fura-2. 2G= 2mM de glucosa; 20G= 20mM de glucosa; Cch= carbacol; LH-21 (antagonista del receptor cannabinoide CB1). N=15 islotes humanos. En la parte inferior de la figura se muestra su correspondiente área bajo la curva (AUC). (*) $p < 0.05$, (***) $p < 0.001$, ANOVA de una vía, post-test de Tukey de comparaciones múltiples.

4.4 MODULACIÓN POR LOS RECEPTORES CB1 Y GPR55 DE LA SECRECIÓN DE INSULINA ESTIMULADA POR GLUCOSA EN ISLOTES PANCREÁTICOS DE RATONES Y HUMANOS

4.4.1 Experimentos de secreción estática de insulina

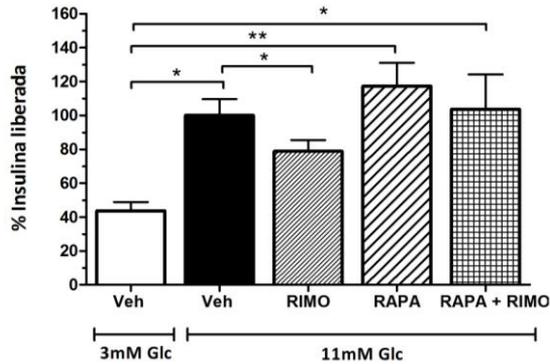
Durante la realización de la presente tesis doctoral se han realizado experimentos de secreción de insulina, tanto estáticos en cultivo, como dinámicos en sistemas de perfusión, empleando islotes pancreáticos aislados de ratón y de humanos, sometidos a diferentes tratamientos farmacológicos.

4.4.1.1 Secreción estática de insulina estimulada por glucosa tras el tratamiento farmacológico de islotes de ratones C57BL/6J sanos y pre-diabéticos con rimonabant, rapamicina o ambos

La **Fig. 14** muestra los resultados de los experimentos de secreción estática de insulina (véase apartado 3.10 de materiales y métodos) realizados en islotes de ratones sanos (**Fig. 14A**) ó ratones pre-diabéticos (**Fig. 14B**) y sometidos a diferentes tratamientos farmacológicos. En concreto, los islotes procedentes de animales alimentados con dietas 10% y 45% en grasa, se sometieron a los 5 tratamientos experimentales siguientes durante 1h: vehículo en un medio con baja glucosa (3mM); vehículo en un medio con alta glucosa (11mM); rimonabant (0.1 μ M); rapamicina (3nM), y rapamicina (3nM) + rimonabant (0.1 μ M). Los tres últimos tratamientos se llevaron a cabo en medios con alta glucosa.

Como puede observarse en la **Fig. 14A**, el rimonabant disminuye la secreción de insulina estimulada por glucosa, en islotes procedentes de ratones C57BL/6J que han sido alimentados con dieta 10% en grasa. Este efecto, es prevenido cuando se incubaba también con el inhibidor de mTORC1 rapamicina. Por el contrario, como se muestra en la **Fig. 14B** en islotes de ratones pre-diabéticos, el efecto causado por el rimonabant sobre la secreción de insulina (similar en tendencia al causado en islotes de animales sanos, aunque sin significación estadística), no desaparece en presencia de rapamicina. Este hecho sugiere que la conexión observada entre la señalización mediada por CB1 y la ruta de mTORC1 mostrada en islotes de ratones sanos desaparece en animales pre-diabéticos. Además, los islotes de estos animales, como era esperable, muestran una menor capacidad de respuesta a los cambios en los niveles de glucosa del medio.

A Secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS) en islotes de ratones sanos



B Secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS) en islotes de ratones pre-diabéticos

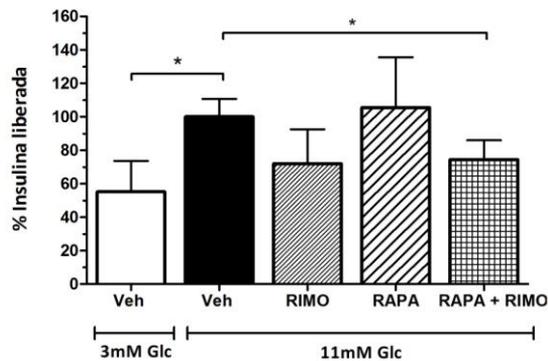


Figura 14. Secreción estática de insulina estimulada por glucosa en islotes de ratones sanos y pre-diabéticos. (A) GSIS medida en islotes de ratones C57BL/6J alimentados con una dieta al 10% en grasa y tratados *in vitro* con vehículo (Veh), Rimonabant (Rimo), Rapamicina (Rapa) ó Rapa+Rimo, (B), GSIS medida en islotes de ratones C57BL/6J alimentados con una dieta al 45% en grasa y tratados *in vitro* con Veh, Rimo, Rapa ó Rapa+Rimo; concentración de Rimo = 0.1µM. Concentración de Rapa = 3nM. Glc= glucosa. Como vehículo se empleó etanol al 0.1%. (*) p<0.05, (**) p<0.01, ANOVA de una vía, post-test Dunnett; 5 islotes en cada pocillo; N=6 pocillos por cada grupo experimental. Cuantificación de insulina mediante ELISA.

4.4.1.2 Secreción estática de insulina estimulada por glucosa tras el tratamiento farmacológico de islotes de ratones C57BL/6J y GPR55^{-/-} con LH-21

Se ha estudiado el efecto del antagonista de CB1, LH-21, sobre la secreción estática de insulina estimulada por glucosa en islotes pancreáticos de ratones controles (C57BL/6J) y ratones GPR55^{-/-}. La **Fig. 15A** muestra cómo LH-21 no modifica la secreción de insulina estimulada por glucosa en los islotes C57BL/6J (GPR55^{+/+}), aunque sí produce una disminución significativa de la secreción de esta hormona en islotes de ratones C57BL/6J homocigotos nulos para GPR55 (GPR55^{-/-}) a las concentraciones de 0.1 y 1μM (**Fig. 15B**).

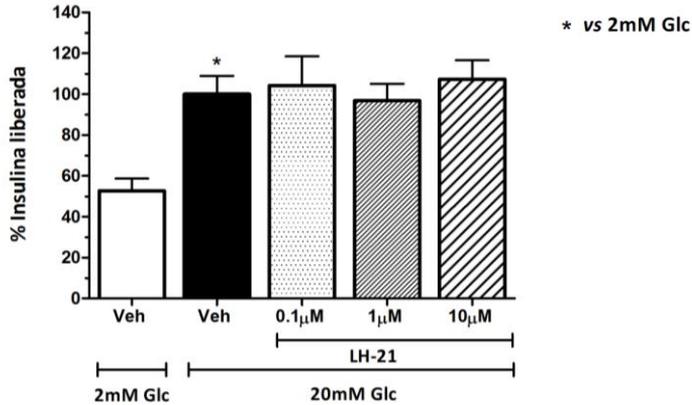
4.4.1.3 Secreción estática de insulina estimulada por glucosa tras el tratamiento farmacológico de islotes de ratones C57BL/6J y GPR55^{-/-} con Abn-CBD

Experimentos de secreción estática de insulina, similares a los comentados anteriormente, se llevaron a cabo tratando los islotes con el agonista del receptor GPR55, Abn-CBD. La **Fig. 16A** muestra que, al igual que LH-21, Abn-CBD no parece tener efectos que resulten significativos sobre la secreción estática de insulina en islotes aislados de ratones C57BL/6J. Tampoco se observan efectos significativos de este fármaco, sobre la liberación de insulina en islotes aislados de ratones GPR55^{-/-} (**Fig. 16B**).

4.4.1.4 Secreción estática de insulina estimulada por glucosa tras el tratamiento farmacológico de islotes de ratones ICR e islotes humanos con los ligandos cannabinoides LH-21 y Abn-CBD

En la **Fig. 17**, se muestra la producción de insulina estimulada por glucosa de islotes pancreáticos aislados de ratones ICR (A) ó de islotes humanos (B), tratados durante 1h con LH-21 ó con Abn-CBD. Las concentraciones ensayadas de cada uno de estos ligandos cannabinoides fueron 0.1, 1 ó 10μM. Como puede comprobarse, LH-21 disminuye la secreción de insulina tanto en islotes de ratones ICR como en islotes humanos. Asimismo, Abn-CBD disminuye la secreción de insulina en islotes humanos, mientras que no tiene efecto en islotes de ratones ICR, observándose tan solo una tendencia de la insulina a disminuir con dosis de 1μM de Abn-CBD.

A Secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS) en islotes de ratones C57BL/6J tratados con LH-21



B Secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS) en islotes de ratones C57BL/6J GPR55^{-/-} tratados con LH-21

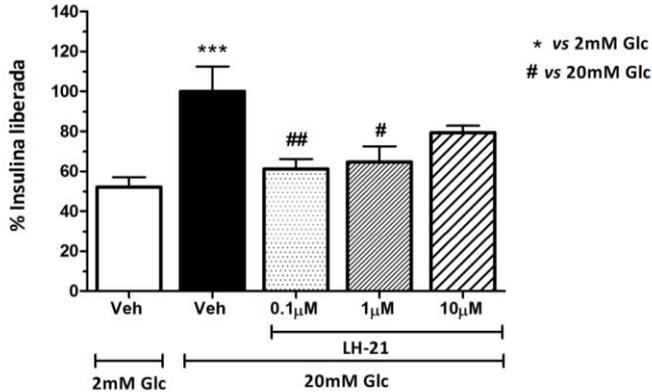
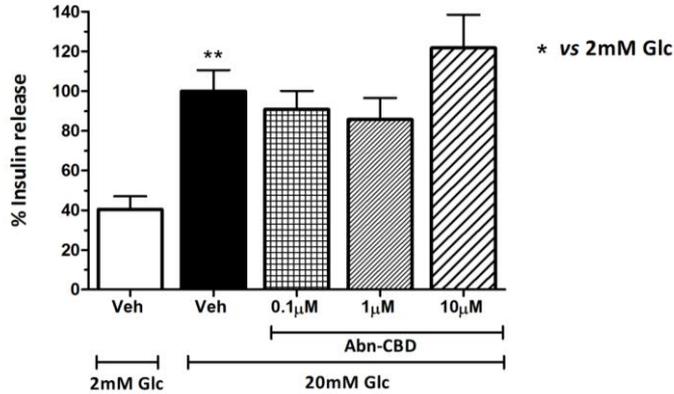


Figura 15. Secreción estática de insulina estimulada por glucosa en islotes de ratones C57BL/6J y C57BL/6J GPR55^{-/-} tratados *in vitro* con LH-21. A) GSIS medida en islotes de ratones C57BL/6J tratados durante 1 hora con LH-21 a 0.1, 1 y 10µM. B) GSIS medida en islotes de ratones C57BL/6J GPR55^{-/-} tratados durante 1 hora con LH-21 a 0.1, 1 y 10µM. Veh= vehículo; Glc=glucosa. Como Veh se empleó DMSO al 0.04% en medio de secreción. (*) p<0.05, (***) p<0.001 vs. Veh 2mM Glc, (#) p<0.05, (##) p<0.01 vs. Veh 20mM Glc, ANOVA de una vía, post-test Dunnett; 5 islotes en cada pocillo; N=6 pocillos por cada grupo experimental; 3 experimentos independientes. Cuantificación de insulina mediante RIA.

A

Secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS)
en islotes de ratones C57BL/6J tratados con Abn-CBD



B

Secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS)
en islotes de ratones C57BL/6J GPR55^{-/-} tratados con Abn-CBD

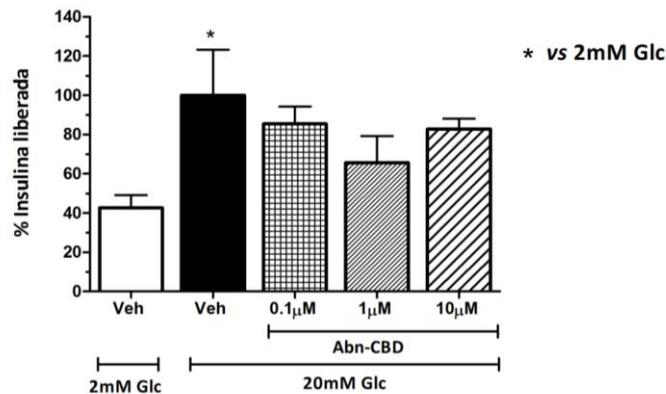
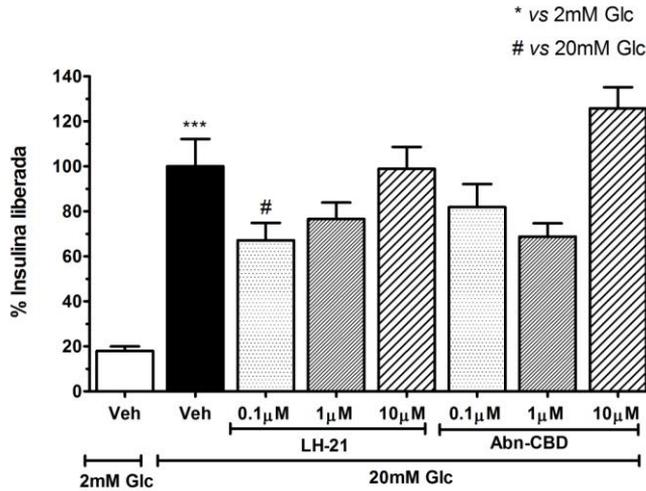


Figura 16. Secreción estática de insulina estimulada por glucosa en islotes de ratones C57BL/6J y C57BL/6J GPR55^{-/-} tratados *in vitro* con Abn-CBD. A) GSIS medida en islotes de ratones C57BL/6J tratados durante 1 hora con Abn-CBD a 0.1, 1 y 10µM. B) GSIS medida en islotes de ratones C57BL/6J GPR55^{-/-} tratados durante 1 hora con Abn-CBD a 0.1, 1 y 10µM. Veh= vehículo; Glc=glucosa. Como Veh se empleó DMSO al 0.04%. (*) p<0.05, (**) p<0.01 vs. Veh 2mM Glc, ANOVA de una vía, post-test Dunnett; 5 islotes en cada pocillo; N=6 pocillos por cada grupo experimental; 2 experimentos independientes. Cuantificación de insulina mediante RIA.

A Secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS) en islotes de ratones ICR tratados con LH-21 ó Abn-CBD



B

Secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS) en islotes humanos tratados con LH-21 ó Abn-CBD

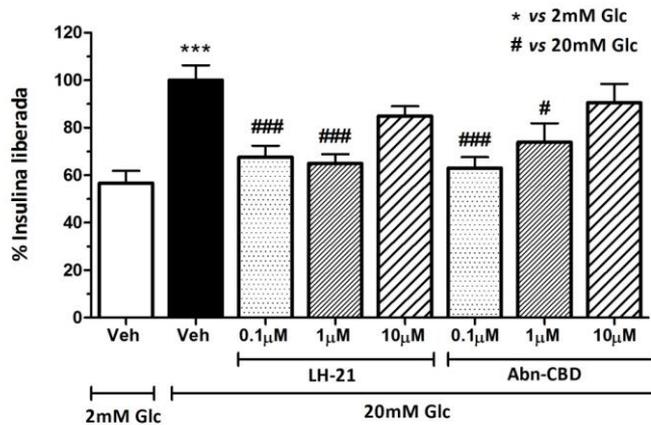


Figura 17. Secreción estática de insulina estimulada por glucosa en islotes de ratones ICR e islotes humanos tratados *in vitro* con diferentes concentraciones de LH-21 o Abn-CBD.

A) Efecto sobre los islotes de ratones ICR, B) Efecto sobre los islotes humanos. Veh=vehículo; Glc=glucosa; LH-21 (antagonista del receptor cannabinoide CB1); Abn-CBD (agonista del receptor GPR55). Como Veh se empleó DMSO al 0.04% en medio de secreción. (*) $p < 0.05$ vs. Veh 2mM Glc, (#) $p < 0.05$, (###) $p < 0.001$ vs. Veh 20mM Glc, ANOVA de una vía, post-test Dunnett; 5 islotes en cada pocillo; N=6 pocillos por cada grupo experimental; 3 experimentos independientes. Cuantificación de insulina mediante RIA.

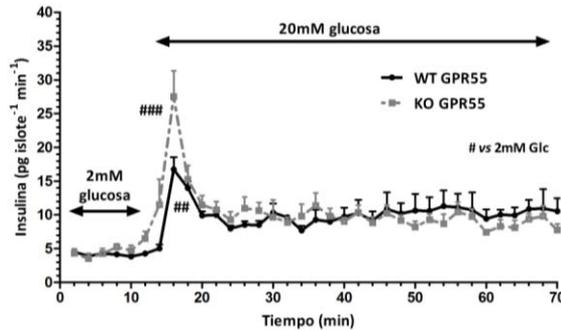
4.4.2 Experimentos de secreción dinámica de insulina

4.4.2.1 Secreción dinámica de insulina estimulada por glucosa en islotes pancreáticos aislados de ratones C57BL/6J y GPR55^{-/-} tratados con LH-21

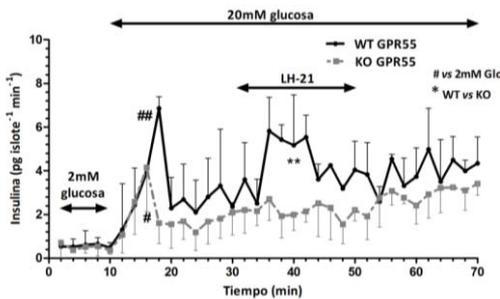
En la **Fig. 18** se muestran gráficos representativos de medidas de secreción dinámica de insulina, llevados a cabo mediante perfusión en un sistema multicanal, de islotes pancreáticos aislados de ratones C57BL/6J WT y GPR55^{-/-}, que fueron tratados, bien sólo con vehículo o con concentraciones de LH-21 de 1nM, 0.1μM, 1μM ó 10μM. Las concentraciones de insulina se expresan en pg islote⁻¹ min⁻¹, y fueron medidas mediante RIA (véase el apartado 3.13 de materiales y métodos). Durante los primeros 10min de perfusión se empleó un medio con una concentración baja en glucosa (2mM) y en los 60min restantes la concentración de glucosa fue alta (20mM). En todos los casos LH-21 se añadió a los 30min de iniciar la perfusión y se mantuvo hasta el minuto 50 (la duración de los tratamientos está representada por barras horizontales).

En la **Fig. 18A** se observa cómo la cinética de secreción de insulina de islotes de ratones C57BL/6J WT es muy parecida a la de los islotes de ratones GPR55^{-/-}. La presencia de LH-21 aumentó la liberación de insulina, pero mostró un comportamiento diferencial en los dos tipos de islotes (los procedentes de animales C57BL/6J WT y GPR55^{-/-} en función a su concentración). Así, y como puede observarse en las **Fig. 18B y 18C**, a las concentraciones más bajas de LH-21 ensayadas, 1nM y 0.1μM, este fármaco incrementó la secreción de insulina significativamente sólo en los islotes procedentes de ratones C57BL/6J WT y no en los procedentes de animales GPR55^{-/-}. A concentraciones más elevadas de LH-21 (**Fig. 18D y 18E**), 1μM y 10μM, en cambio, el comportamiento es totalmente opuesto, incrementándose el nivel de insulina sólo en los islotes de animales GPR55^{-/-} y no en el de los WT. Estos resultados sugieren que LH-21 a bajas concentraciones actúa a través de un mecanismo dependiente del receptor GPR55, mientras que a concentraciones más altas lo haría a través de un mecanismo independiente del mismo.

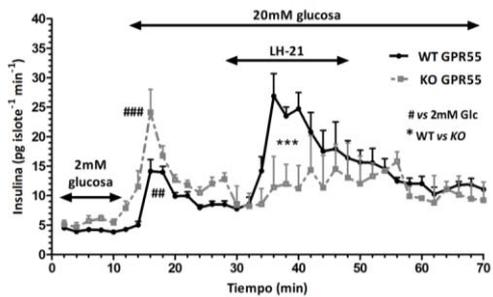
A) Vehículo en islotes de ratones C57BL/6J y C57BL/6J GPR55^{-/-}



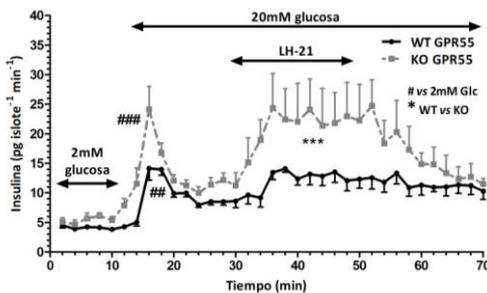
B) Efecto de LH-21 a 1nM en islotes de ratones C57BL/6J y C57BL/6J GPR55^{-/-}



C) Efecto de LH-21 a 0.1µM en islotes de ratones C57BL/6J y C57BL/6J GPR55^{-/-}



D) Efecto de LH-21 a 1µM en islotes de ratones C57BL/6J y C57BL/6J GPR55^{-/-}



E) Efecto de LH-21 a 10µM en islotes de ratones C57BL/6J y C57BL/6J GPR55^{-/-}

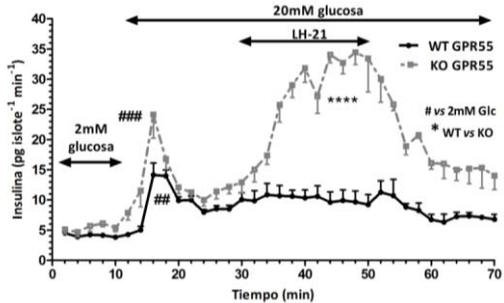


Figura 18. Secreción dinámica de insulina de islotes pancreáticos procedentes de ratones C57BL/6J y C57BL/6J GPR55^{-/-} tratados con LH-21. A) Respuesta de los islotes de ratones de ambos genotipos a la estimulación con 20mM de glucosa; (B) 20mM de glucosa + LH-21 1nM (C); 20mM glucosa + LH-21 0.1µM; (D) 20mM glucosa + LH-21 1µM y (E), 20mM glucosa + LH-21 10µM. Se usó un sistema de perfusión multicanal. El fármaco se añadió al medio de perfusión a los 30min y se retiró a los 50min, como indican las flechas horizontales. Glc=glucosa. Como vehículo se empleó DMSO 0.04%. (#) p<0.05; (##) p<0.01; (###) p<0.001 vs. 2mM Glc; (*) p<0.01; (***) p<0.001 C57BL/6J vs. C57BL6/J GPR55^{-/-}, ANOVA de medidas repetidas; 40 islotes por cada cámara de perfusión; N=4 cámaras por cada condición experimental. 3 experimentos diferentes. Cuantificación de insulina mediante RIA.

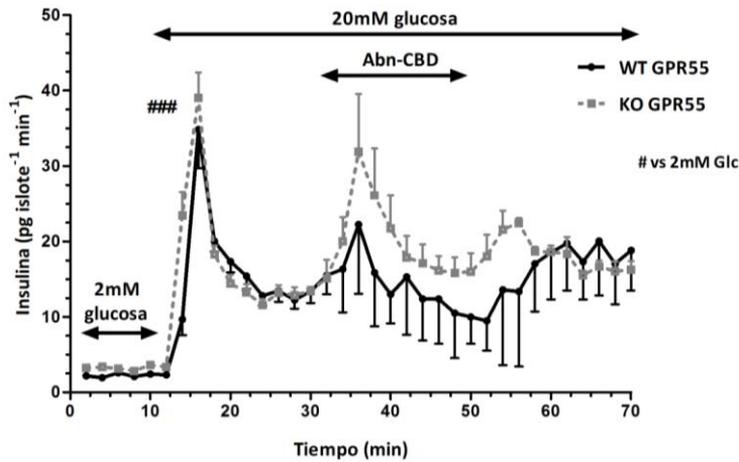
4.4.2.2 Secreción dinámica de insulina estimulada por glucosa en islotes pancreáticos aislados de ratones C57BL/6J y GPR55^{-/-} tratados con Abn-CBD

Se llevaron a cabo también estudios de secreción dinámica de insulina (véase apartado 3.12 de materiales y métodos) en ratones C57BL/6J WT y GPR55^{-/-} añadiendo al medio de perfusión Abn-CBD a diferentes concentraciones, desde el minuto 30 al 50 de la perfusión. En la **Fig. 19** se muestran gráficas representativas de estos experimentos. La **Fig. 19A** muestra la secreción dinámica de insulina en presencia de Abn-CBD (1 μ M) en islotes de ratones C57BL/6J WT y KO (GPR55^{-/-}) de GPR55. Se observa un incremento de la secreción de insulina en respuesta a Abn-CBD tanto en los islotes procedentes de los animales WT como en los GPR55^{-/-}. Al no ser funcional el receptor GPR55 en estos ratones, estos incrementos deberían estar relacionados con la interacción de Abn-CBD con un receptor diferente. Por otra parte, sorprendentemente, cuando se emplea Abn-CBD a 10 μ M (**Fig. 19B**), se observan incrementos mayores de insulina en los islotes procedentes de los animales C57BL/6J KO. Como resumen, estos resultados sugieren que Abn-CBD podría mediar sus efectos sobre la secreción de insulina de manera dependiente o independiente del receptor GPR55, en función de su concentración.

4.4.2.3 Secreción dinámica de insulina estimulada por glucosa en islotes humanos tratados con LH-21 y Abn-CBD

En la **Fig. 20** se muestran gráficas representativas de medidas de secreción dinámica de insulina llevadas a cabo con un sistema de perfusión multicanal, empleando islotes pancreáticos humanos que fueron tratados, bien sólo con el ligando cannabinoide LH-21 (A) ó Abn-CBD (B). En todos los experimentos se representa la insulina secretada en pg islote⁻¹ min⁻¹. En los primeros 10min de perfusión se empleó un medio con una concentración de glucosa de 2mM (baja glucosa); a partir de ese momento, la concentración de glucosa del medio se incrementó a 20mM (alta glucosa), manteniéndose así hasta el final de la perfusión. En la **Fig. 20A** puede observarse que la adición al medio de perfusión de dosis crecientes de LH-21 (0.1 y 1 μ M) incrementa en un modo dosis-dependiente la magnitud de la secreción de insulina durante el tiempo en que el estímulo se mantiene. Por otro lado, y de un modo similar, la **Fig. 20B** muestra cómo la adición al medio de perfusión de dosis crecientes de Abn-CBD (0.1, 1 y 10 μ M) aumenta igualmente la magnitud de la secreción de insulina de manera dosis-dependiente. Por consiguiente, tanto LH-21 como Abn-CBD aumentan la secreción de insulina, medida en experimentos de secreción dinámica, en islotes humanos.

A) Efecto de Abn-CBD a 1µM en islotes de ratones C57BL/6J y C57BL/6J GPR55^{-/-}



B) Efecto de Abn-CBD a 10µM en islotes de ratones C57BL/6J y C57BL/6J GPR55^{-/-}

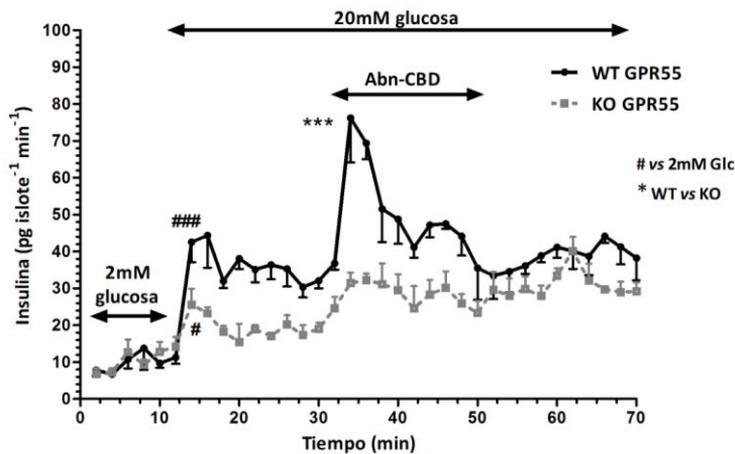
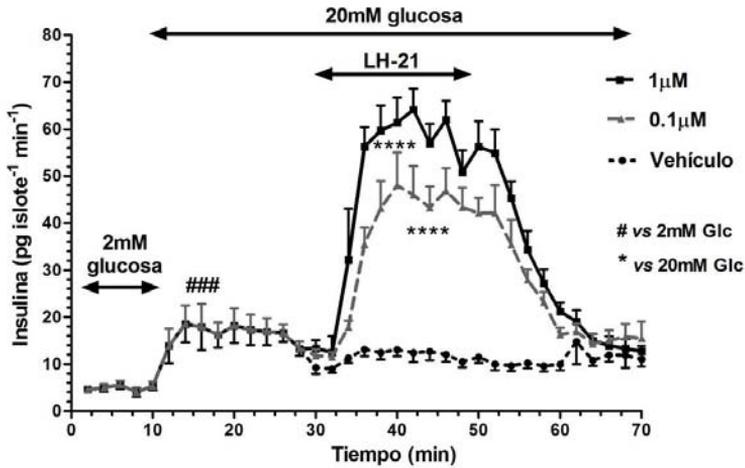


Figura 19. Secreción dinámica de insulina de islotes pancreáticos procedentes de ratones C57BL/6J y C57BL/6J GPR55^{-/-} tratados con Abn-CBD. Islotes pancreáticos de ambos genotipos tratados con Abn-CBD a 1µM (A) y 10µM (B). El fármaco se añadió al medio de perfusión a los 30min y se retiró a los 50min, como indican las flechas horizontales. Glc=glucosa. Como vehículo se empleó DMSO 0.06%. (#) p<0.05, (###) p<0.001 vs. 2mM Glc; (***) p<0.001 C57BL/6J vs. C57BL6/J GPR55^{-/-}, ANOVA de medidas repetidas; 40 islotes por cada cámara de perfusión; N=4 cámaras por cada condición experimental. 3 experimentos diferentes. Cuantificación de insulina mediante RIA.

A) Efecto de LH-21 (0.1 μ M y 1 μ M) en islotes pancreáticos humanos



B) Efecto de Abn-CBD (0.1 μ M-10 μ M) en islotes pancreáticos humanos

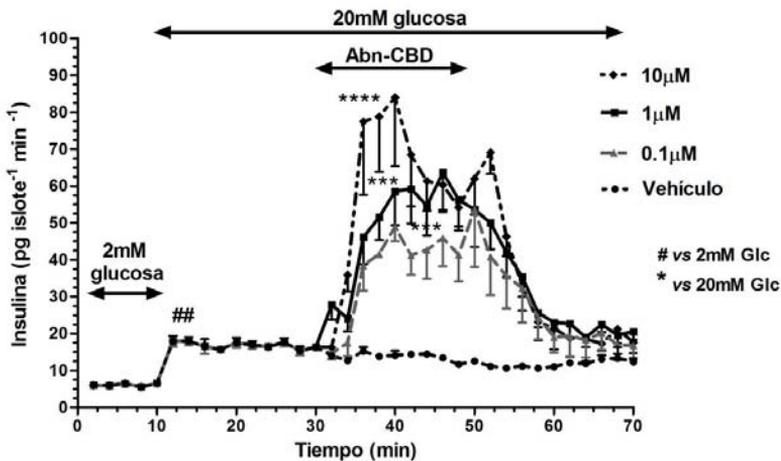


Figura 20. Secreción dinámica de insulina de islotes pancreáticos humanos tratados con LH-21 y Abn-CBD. A) Experimentos dosis-respuesta con LH-21 a concentraciones 0.1 y 1 μ M, B) Experimentos dosis-respuesta con Abn-CBD a concentraciones 0.1, 1 y 10 μ M. Los estímulos fueron añadidos al medio de perfusión desde los minutos 30 al 50, como indican las flechas horizontales. Glc=glucosa. Como vehículo se empleó DMSO 0.04%. (##) $p<0.01$; (###) $p<0.001$ vs. 2mM Glc; (***) $p<0.001$; (****) $p<0.0001$ vs. 20mM Glc; ANOVA de medidas repetidas; se emplearon 50 islotes por cada cámara de perfusión; N=4 cámaras por cada condición experimental. 4 experimentos diferentes. Cuantificación de insulina mediante RIA.

4.5 MODULACIÓN POR CB1 DE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS) EN ISLOTES PANCREÁTICOS AISLADOS DE RATAS WISTAR Y RATONES C57BL/6J

4.5.1 Producción de ROS en islotes pancreáticos aislados de ratas Wistar tratados *in vitro* a baja y alta glucosa

Como se ha indicado en el apartado de materiales y métodos (3.14) la producción *in vitro* de especies reactivas de oxígeno, ROS, puede ser evaluada mediante análisis densitométrico de las imágenes de microscopía confocal producida por los islotes pancreáticos cuando éstos son tratados con la sonda hidroetidina. En la **Fig. 21A** se muestran imágenes representativas obtenidas con microscopia confocal de las señales fluorescentes producidas por la producción de ROS por islotes de ratas Wistar en respuesta a baja glucosa (3.3mM Glc) y alta glucosa (16.7mM Glc). En la **Fig. 21B** se representa gráficamente la cuantificación densitométrica de dichas imágenes. Puede concluirse de este análisis que la producción de ROS en islotes pancreáticos aislados de ratas Wistar es significativamente mayor (aproximadamente un 40%) en condiciones de baja glucosa (3.3mM) que en alta glucosa (16.7mM).

4.5.2 Producción de ROS en islotes pancreáticos de ratas Wistar tratados *in vitro* con los ligandos cannabinoides ACEA y Rimonabant

En la **Fig. 22A** se muestran los resultados obtenidos cuando se lleva a cabo un análisis de la producción de ROS en islotes pancreáticos de ratas Wistar que han sido tratados *in vitro* durante 1h con el agonista del receptor cannabinoide CB1, ACEA (0.1 μ M), o con vehículo (DMSO 0.1%) a baja (3.3mM) y alta glucosa (16.7mM). Dicho análisis pone de manifiesto que ACEA disminuye significativamente ROS, en torno a un 40%, respecto a los controles, en condiciones de baja glucosa (3.3mM), mientras que no ejerce ningún efecto cuando la concentración de glucosa se incrementa a 16.7mM.

Con objeto de estudiar si el efecto de disminución de ROS observado con el tratamiento con ACEA a 3.3mM glucosa estaba mediado por los receptores CB1, se realizó un experimento en el que los islotes primero se pre-incubaron (3h) con Rimo (antagonista de CB1) y a continuación se estimularon con ACEA durante 1h más, manteniendo el bloqueo de CB1 con rimonabant. El resultado de este experimento se recoge en la **Fig. 22B**, donde se muestra cómo el bloqueo de CB1 impide la disminución de ROS inducido por ACEA, lo cual sugiere que el efecto de ACEA está mediado por CB1. La concentración de Rimo y de ACEA en este experimento fue de 0.1 μ M.

Por otro lado, el efecto causado por rimonabant (0.1 μ M) sobre la producción de ROS fue también analizado en islotes pancreáticos obtenidos de ratas Wistar en situación de baja (3.3mM) y alta (16.7mM) glucosa. Tal y como se observa en la Fig. 22C, rimonabant no ejerce efecto alguno sobre la producción de ROS ni a baja ni a alta glucosa. El rimonabant ha sido utilizado a esta dosis ya que en otros experimentos hemos comprobado que es una dosis activa. De hecho, como se observa en la Fig. 22B, esta dosis es capaz de prevenir el efecto de ACEA sobre ROS.

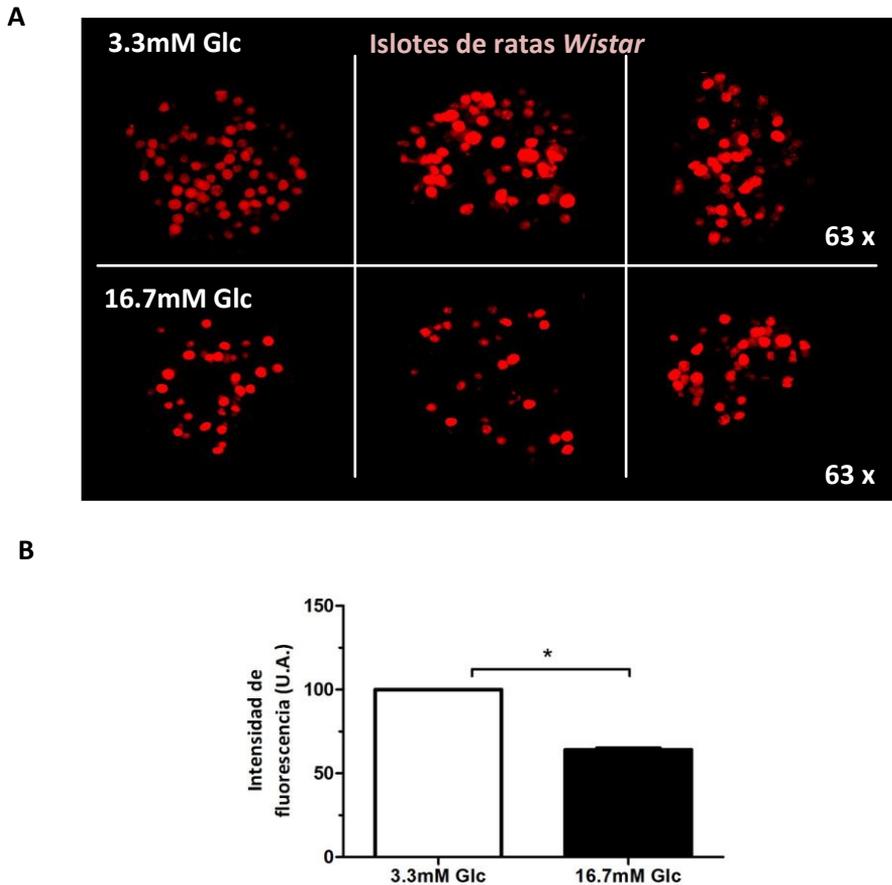


Figura 21. Efecto del metabolismo de la glucosa sobre la producción de ROS en islotes pancreáticos de ratas Wistar. A) Imágenes representativas de microscopía confocal de la fluorescencia emitida por la reacción de las ROS producidas por islotes pancreáticos de ratas Wistar con la sonda fluorescente hidroetidina, en respuesta al tratamiento de los mismos con glucosa 3.3mM y 16.7mM, respectivamente. (B) Cuantificación densitométrica de las señales fluorescentes producidas corregidas en función al área de los islotes (Morgan *et al.*, 2007). Los datos se han referido a la condición 3.3mM de glucosa, que tomamos como 100%. Glc= glucosa. (*) $p < 0.05$; N=6-7 islotes por condición; Test t-Student; 3 experimentos independientes.

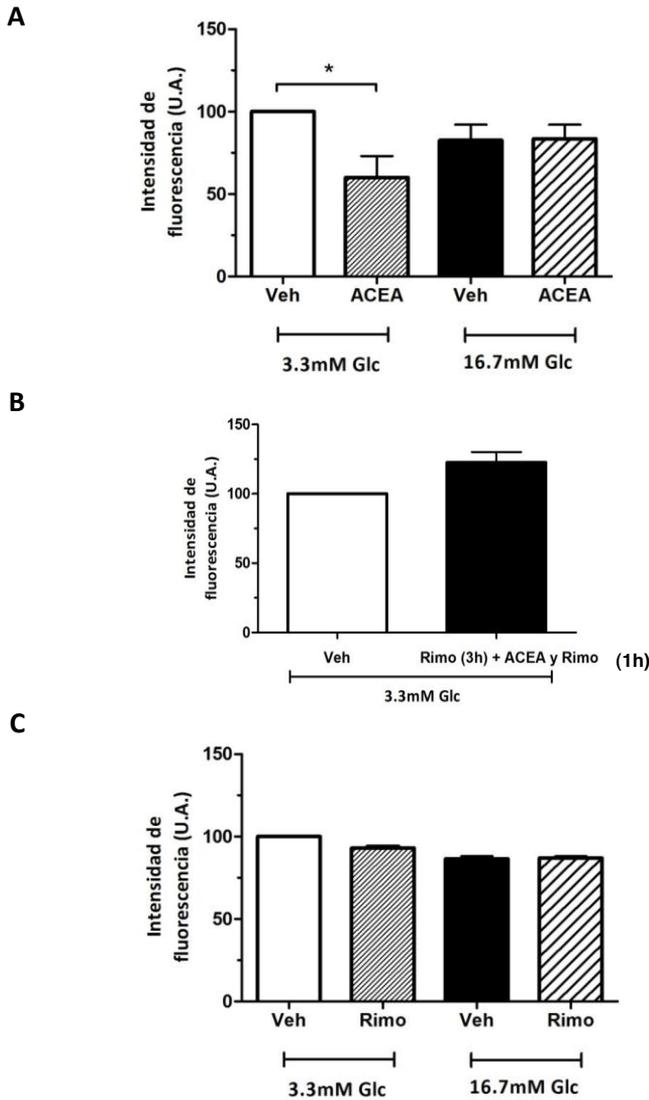


Figura 22. Producción de ROS en islotes pancreáticos de ratas Wistar en respuesta a agonistas y antagonistas de CB1. (A) Efecto de la ACEA (0.1 μ M), agonista selectivo del receptor CB1, sobre la producción de ROS en islotes pancreáticos de ratas Wistar a 3.3mM y 16.7mM Glc, B) Efecto del pre-tratamiento con rimonabant (0.1 μ M, 3h) sobre la producción de ROS inducida por ACEA (0.1 μ M, 1h) a 3.3mM de glucosa en islotes pancreáticos de ratas Wistar, C) Efecto de rimonabant (0.1 μ M), antagonista del receptor CB1, sobre la producción de ROS en islotes pancreáticos de ratas Wistar a 3.3mM y 16.7mM Glc. Todos los datos presentados hacen referencia a la cuantificación densitométrica de las imágenes de fluorescencia obtenidas en respuesta a ROS producidas por la situación Veh a 3.3mM de glucosa, que se toma como 100%. Veh= vehículo (DMSO 0.1%); Glc= glucosa. (*) $p < 0.05$ vs. Veh, test t-Student; $n = 5-7$ islotes por grupo experimental; 3 experimentos independientes en cada panel; 2 ratas en cada experimento.

4.5.3 Producción de ROS en islotes pancreáticos de ratones C57BL/6J a baja y alta glucosa

La producción *in vitro* de ROS fue analizada, también, en islotes pancreáticos aislados de ratones C57BL/6J en condiciones de baja (3.3mM) y alta (16.7mM) glucosa. Los islotes se mantuvieron durante 1h en cada una de esas condiciones y posteriormente se midió el nivel de ROS empleando el mismo procedimiento indicado anteriormente para islotes de ratas Wistar. En la **Fig. 23A** se muestran imágenes representativas obtenidas con microscopia confocal de las señales fluorescentes producidas por los islotes en respuesta a la producción ROS tras estimulación con baja y alta glucosa. La **Fig. 23B** muestra la cuantificación densitométrica de dichas señales. Puede concluirse de este análisis densitométrico que la producción de ROS en islotes pancreáticos aislados de ratones C57BL/6J es significativamente mayor (aproximadamente un 75%) en condiciones de baja glucosa (3.3mM) que en alta glucosa (16.7mM), de un modo similar a como vimos en islotes pancreáticos de rata.

4.5.4 Producción de ROS en islotes pancreáticos de ratones C57BL/6J tratados *in vitro* con los ligandos cannabinoides ACEA y rimonabant

Dados los resultados obtenidos en rata, quisimos validarlos en ratón, para posteriormente comprobar la producción de ROS en islotes de ratones controles y pre-diabéticos. La **Fig. 24A** muestra la producción de ROS en islotes de ratones C57BL/6J en condición de baja glucosa (aquella a la que encontramos efectos en rata) y a distintas dosis del agonista específico de CB1, ACEA (0.001 μ M, 0.01 μ M y 0.1 μ M). La cuantificación de la fluorescencia emitida muestra cómo este fármaco, en el rango de concentraciones desde 0.01-0.1 μ M, y a 3.3mM de glucosa, produce una disminución de la producción de ROS respecto al vehículo (DMSO 0.2%). Estos resultados son similares a los comentados empleando islotes pancreáticos de ratas Wistar (**Fig. 22A**).

Al igual que en el caso de los islotes de ratas Wistar, con objeto de estudiar si la disminución en la producción de ROS inducida por ACEA en los islotes de ratón está mediada por CB1, se realizó un experimento de pre-incubación con el antagonista de CB1, rimonabant, así como una posterior incubación simultánea con ACEA y rimonabant durante 1h. La **Fig. 24B** muestra cómo el bloqueo de CB1 previene la disminución de ROS mediada por ACEA. Las concentraciones de ACEA y Rimo empleadas fueron 0.01 μ M y 0.1 μ M, respectivamente.

Asimismo, quisimos ver si rimonabant tenía un efecto *per se* sobre la producción de ROS en condiciones de baja glucosa. Para ello se realizaron experimentos similares a

los descritos con anterioridad pero tratando los islotes con diferentes dosis de rimonabant (0.001 μ M, 0.01 μ M y 0.1 μ M). Como muestra la **Fig. 24C**, el bloqueo *in vitro* del receptor cannabinoide CB1 con rimonabant incrementó la producción de ROS en islotes pancreáticos aislados de ratones C57BL/6J, a 0.01 μ M y 0.1 μ M. En conjunto, estos resultados muestran que a baja glucosa la estimulación de CB1 disminuye la producción de ROS mientras que el bloqueo de CB1 la incrementa.

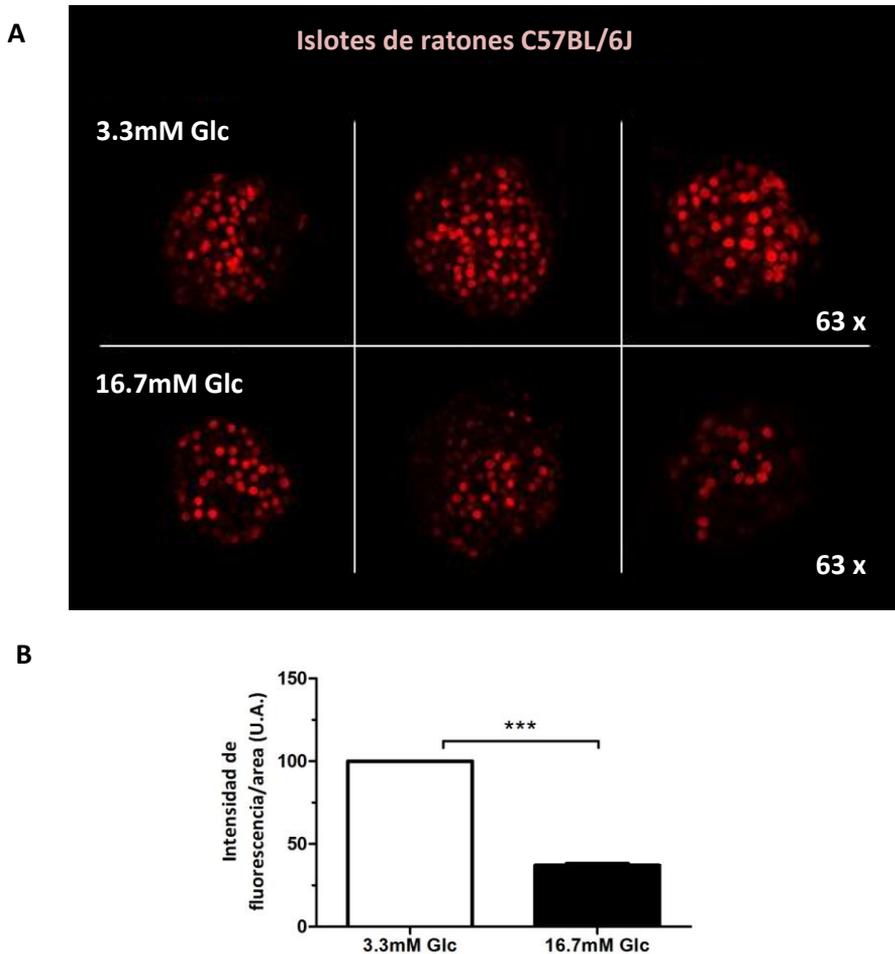


Figura 23. Efecto del metabolismo de la glucosa sobre la producción de ROS en islotes pancreáticos de ratones C57BL/6J. A) Imágenes representativas de microscopía confocal de la fluorescencia emitida por la reacción de ROS producidas por islotes pancreáticos de ratones C57BL/6J con la sonda fluorescente hidroetidina, en respuesta al tratamiento de los mismos con glucosa a 3.3mM y 16.7mM, respectivamente. B) Cuantificación densitométrica de las señales fluorescentes producidas corregidas en función del área de los islotes (Morgan *et al.*, 2007). Los datos se han referido a la condición 3.3mM de glucosa, que tomamos como 100%. Glc= glucosa. (***) $p < 0.001$, test t-Student; N=10-14 islotes; 3 experimentos independientes; 2 ratones en cada experimento.

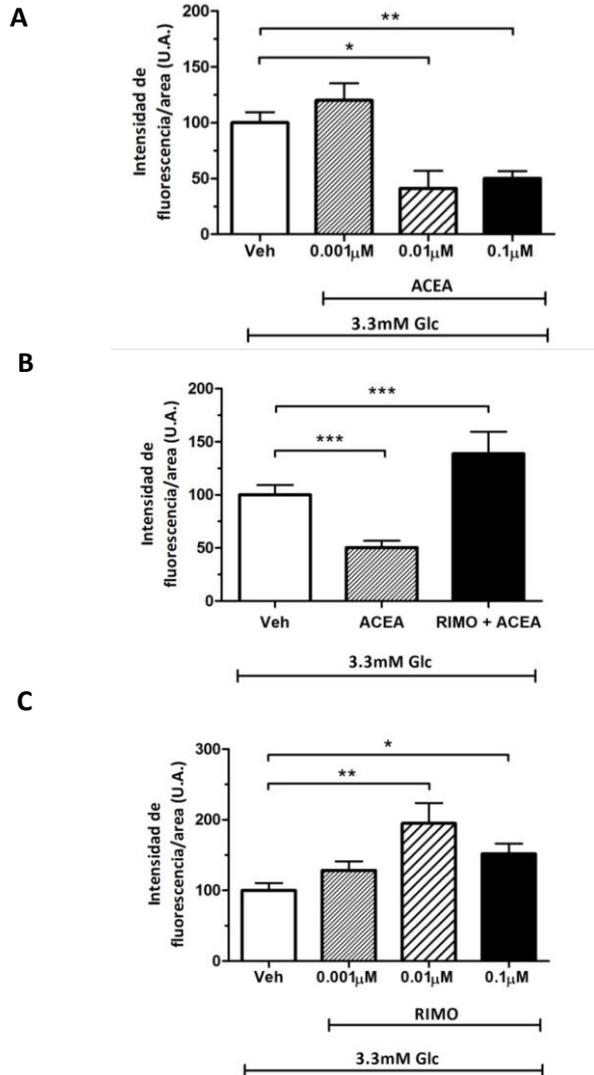


Figura 24. Producción de ROS en islotes pancreáticos de ratones C57BL/6J en respuesta a agonistas y antagonistas de CB1. A) Efecto de diferentes dosis de ACEA (0.001, 0.01 y 0.1 μ M), agonista selectivo del receptor CB1, sobre la producción de ROS en islotes pancreáticos de ratones C57BL/6J a 3.3mM Glc, B) Efecto del pre-tratamiento con rimonabant (0.1 μ M, 15min) sobre la producción de ROS inducida por ACEA (0.01 μ M) a 3.3mM de glucosa en islotes pancreáticos de ratones C57BL/6J, C) Efecto de diferentes dosis de rimonabant (0.001, 0.01 y 0.1 μ M), antagonista del receptor CB1, sobre la producción de ROS en islotes pancreáticos de ratones C57BL/6J a 3.3mM Glc. Todos los datos presentados hacen referencia a la cuantificación densitométrica de las imágenes de fluorescencia obtenidas en respuesta a ROS producidas por la situación Veh a 3.3mM de glucosa, que se toma como 100%. Veh= vehículo (para la ACEA, DMSO 0.2%; para RIMO, etanol al 0.1%); Glc= glucosa, RIMO= rimonabant; (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$, ANOVA de una vía, post-test Dunnett; N=10-20 islotes; 3 experimentos independientes para cada panel; 2 ratones en cada experimento.

4.5.5 Producción de ROS en islotes pancreáticos de ratones C57BL/6J pre-diabéticos y tratados *in vitro* con rimonabant

Como se ha comentado anteriormente, la producción de ROS fue medida también en islotes pancreáticos de ratones sanos y pre-diabéticos. Dado que el bloqueo de CB1 ha sido ampliamente descrito como beneficioso en las condiciones de obesidad y diabetes, quisimos valorar asimismo su efecto sobre la producción de ROS. Como se observa en la **Fig. 25**, la producción de ROS en animales pre-diabéticos es en torno a un 40% menor que la de los ratones que se alimentaron con dieta control (10% grasa). Asimismo, el tratamiento con rimonabant (0.1 μ M) en condiciones de baja glucosa (3.3mM) incrementó significativamente la producción de ROS en los islotes pancreáticos de ratones sanos. Sin embargo, este incremento de ROS inducido por rimonabant no se observa en los islotes de animales pre-diabéticos, que muestran una producción de ROS similar a los tratados con el vehículo.

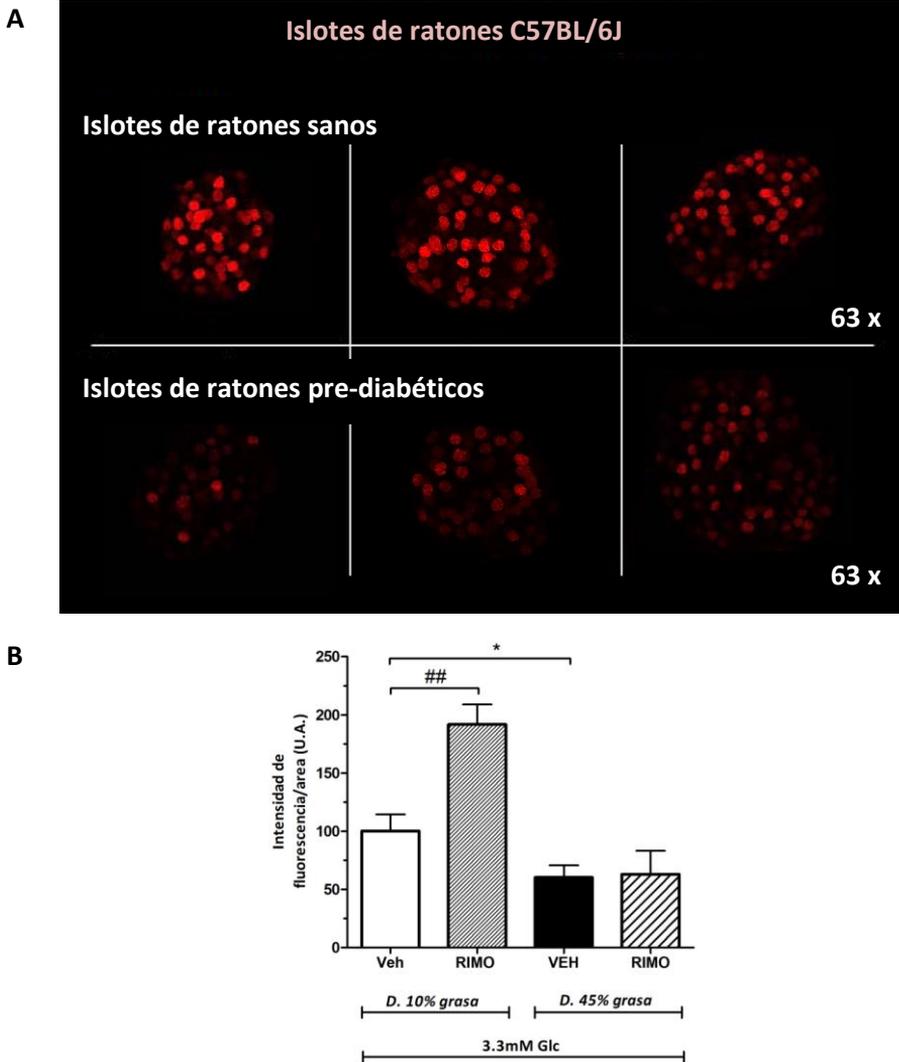


Figura 25. Producción de ROS en islotes pancreáticos de ratones C57BL/6J controles (sanos, dieta 10% grasa) y pre-diabéticos (dieta 45% en grasa) en respuesta a rimonabant. A) Imágenes representativas de microscopía confocal de la fluorescencia emitida por la reacción de ROS producidas por los islotes pancreáticos de ratones sanos y ratones pre-diabéticos con la sonda fluorescente hidroetidina. B) Cuantificación densitométrica de las señales fluorescentes producidas por islotes sanos y pre-diabéticos en respuesta a rimonabant (RIMO) a 0.1 μ M en presencia de glucosa (Glc) 3.3mM. Los datos presentados hacen referencia a la cuantificación densitométrica de las imágenes de fluorescencia obtenidas en respuesta a ROS producidas por los islotes tras el tratamiento indicado, y se muestran referidos a las señales de fluorescencia producidas por la situación Veh a 3.3mM de glucosa, que se toma como 100%. Vehículo del rimonabant= etanol al 0.1%. (*) $p < 0.05$, (##) $p < 0.01$; ANOVA de dos vías, post-test Dunnett; N=6-12 islotes cada grupo, islotes procedentes de 2 ratones para cada condición experimental; 2 experimentos independientes.

4.6 MODULACIÓN POR GPR55 DE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR CITOQUINAS EN ISLOTES PANCREÁTICOS AISLADOS DE RATONES C57BL/6J Y HUMANOS

4.6.1 Actividad de caspasas 3/7 en islotes pancreáticos aislados de ratones C57BL/6J y GPR55^{-/-} tratados con los ligandos cannabinoides LH-21 y Abn-CBD

Finalmente, también nos ha parecido relevante investigar la posible acción moduladora de la apoptosis en islotes pancreáticos aislados por parte de los ligandos LH-21 y Abn-CBD. Para ello, se han utilizado islotes de ratones WT y GPR55^{-/-}, así como islotes humanos. Como activador de la apoptosis se utilizó un cóctel de citoquinas (IL-1 β a 0.5U/ μ l, TNF α a 5U/ μ l e INF γ a 5U/ μ l) el cual, fue añadido al medio de cultivo de los islotes después de haber sido pre-incubados éstos durante 48h con LH-21 o Abn-CBD, ambos a 1 μ M. La **Fig. 26A** muestra los experimentos de inducción de la apoptosis en islotes de ratones WT. Se puede observar cómo el cóctel de citoquinas disueltas en vehículo (Veh+Cito) incrementa aproximadamente 3 veces la capacidad apoptótica de los islotes (estimada mediante la medida de la actividad de caspasas 3/7 (véase el apartado 3.15 de materiales y métodos) en relación a lo que lo hace el vehículo sólo (Veh). Aunque en ausencia de citoquinas, LH-21 y Abn-CBD manifiestan actividades caspasa 3/7 similares al vehículo, cuando ambos fármacos de manera independiente se añaden a los islotes junto al cóctel de citoquinas (LH-21+Cito ó Abn-CBD+Cito), la capacidad apoptótica inducida en los mismos se reduce casi en un tercio respecto a la observada en los islotes tratados en medio Veh+Cito. Esto indica que ambos ligandos cannabinoides, tienen un efecto modulador anti-apoptótico en los islotes pancreáticos aislados de ratones WT.

Un experimento similar fue realizado en islotes de ratones GPR55^{-/-}. En la **Fig. 26B**, puede observarse cómo, el efecto modulador anti-apoptótico de los islotes manifestado por ambos fármacos (LH-21 y Abn-CBD) en presencia de citoquinas es ahora mucho menor que el que se producía en islotes de animales WT. Este hecho sugiere que ambos compuestos tendrían capacidad para disminuir la capacidad apoptótica de los islotes modulando sus acciones a través de los receptores GPR55. Además, comparando las **Fig. 26A** y **Fig. 26B** puede observarse cómo, tras el estímulo pro-apoptótico causado por las citoquinas, las actividades caspasas 3/7 son más elevadas en islotes de ratones GPR55^{-/-} que en los correspondientes a los ratones WT, lo que sugeriría que el receptor GPR55 juega un papel protector frente a la muerte por apoptosis de islotes pancreáticos.

4.6.2 Actividad de caspasas 3/7 en islotes pancreáticos humanos tratados con los ligandos cannabinoides LH-21 y Abn-CBD

Experimentos similares a los comentados anteriormente con islotes de ratón fueron realizados empleando islotes pancreáticos humanos. Del análisis de la **Fig. 26C**, se deducen resultados muy parecidos a los observados en islotes de roedores. Así, los ligandos cannabinoides ensayados (LH-21 y Abn-CBD, ambos a 1 μ M) por sí mismos no modifican los niveles de caspasas 3/7 basales pero, en presencia de citoquinas, provocan una disminución significativa de los niveles de actividad de éstas, en relación a los controles. Por tanto, tanto LH-21 como Abn-CBD parecen ejercer efectos modulares anti-apoptóticos también en islotes humanos.

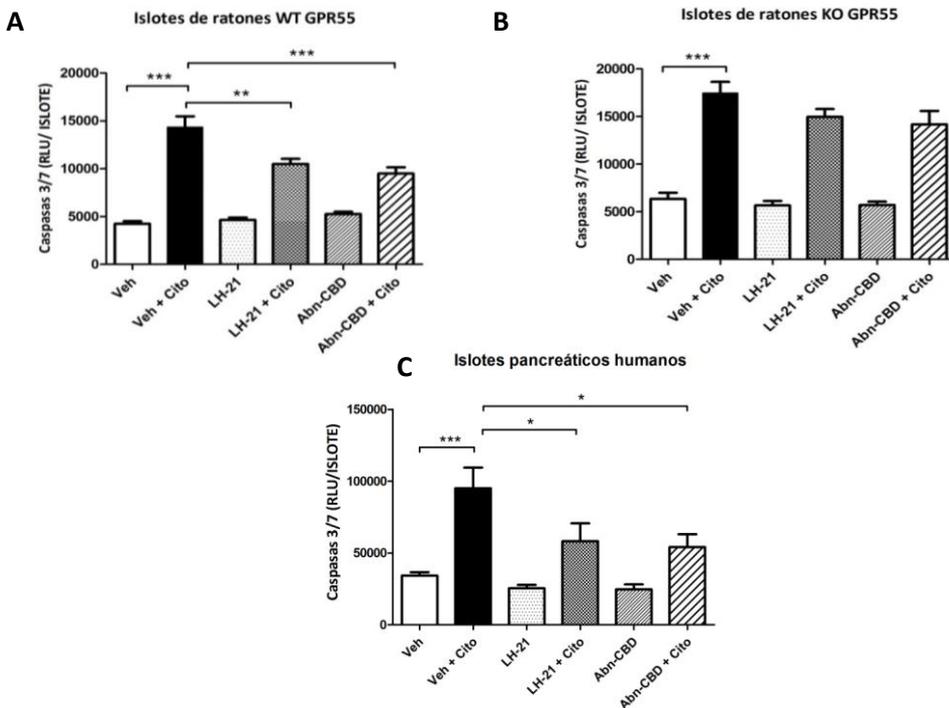


Figura 26. Modulación por LH-21 y Abn-CBD de la apoptosis inducida por citoquinas en islotes pancreáticos de ratones y humanos. Medida de la actividad de las caspasas 3/7 en ausencia y en presencia de citoquinas (20h) en islotes aislados de ratones C57BL/6J WT (A), ratones C57BL/6J GPR55^{-/-} (B) y humanos (C) en presencia de LH-21 o Abn-CBD. Las condiciones empleadas en los experimentos realizados con islotes de ratón fueron: Vehículo, DMSO 0.04%, LH-21 a 0.1 μ M, y Abn-CBD a 10 μ M; (**) p<0.01, (***) p<0.001; 2 experimentos independientes para cada genotipo; N=8 pocillos cada condición, 5 islotes por pocillo; 8 ratones empleados (4 ratones WT C57BL/6J y 4 ratones KO GPR55). Para los experimentos con islotes humanos: Vehículo, DMSO 0.04%, LH-21 y Abn-CBD (ambos a 1 μ M), (*) p<0.05, (***) p<0.001; ANOVA de una vía, post-test Dunnett; 2 experimentos independientes; N=8 pocillos cada condición, 5 islotes por pocillo. Veh=vehículo; Cito=Citoquinas.

V. DISCUSIÓN





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

5.1 EXPRESIÓN Y SEÑALIZACIÓN DE LOS RECEPTORES CB1 Y GPR55 EN ISLOTES PANCREÁTICOS

Como hemos descrito en la sección “materiales y métodos”, para la realización de esta tesis doctoral se ha generado y caracterizado un modelo animal de obesidad y pre-diabetes mediante el suministro prolongado a los mismos de una dieta comercial enriquecida en grasa, en la que la grasa constituía el 45% de las kilocalorías totales ingeridas. Para este fin, se emplearon ratones pertenecientes a la cepa C57BL/6J, un modelo animal caracterizado que desarrolla obesidad y alteraciones en la homeostasis de la glucosa tras el consumo de una dieta alta en grasa (Rebuffé-Scrive *et al.*, 1993; Surwit *et al.*, 1995; Winzell *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2005; Toye *et al.*, 2005; Nishikawa *et al.*, 2007; King, 2012). Como control se emplearon animales que fueron alimentados con una dieta en la que las grasas suponen un 10% de la ingesta calórica. Así, los ratones alimentados con la dieta al 45% en grasa ganaron más peso que los controles, siendo la diferencia estadísticamente significativa desde la semana 8 de inicio de la dieta (**Fig. 1A**), presentando un fenotipo claramente obeso con respecto a los controles a las 15 semanas de dieta.

Con respecto a los test diagnósticos para caracterizar el modelo animal de pre-diabetes, tanto las glucemias basales en ayuna como el test de tolerancia a la glucosa (**Fig. 1B**) y el test de tolerancia a la insulina (**Fig. 1C**), mostraron alteraciones claras en la homeostasis de la glucosa. Así, las glucemias basales presentaban una clara tendencia a ser mayores en los animales alimentados con la dieta al 45% en grasas, siendo estos animales, además, intolerantes a la glucosa y resistentes a la insulina. Asimismo, los niveles plasmáticos de insulina (**Fig. 2A**) y leptina (**Fig. 2C**), fueron notablemente mayores en los ratones obesos.

Todos los datos presentados confirman que los ratones que fueron alimentados con una dieta con alto contenido graso durante 15 semanas presentan rasgos típicos de la pre-diabetes, asemejándose metabólicamente a los sujetos pre-diabéticos humanos y constituyendo por tanto un modelo válido para el estudio molecular de las vías de señalización y de los procesos que se alteran durante la patogénesis de la diabetes tipo 2. En concreto, en este trabajo se ha utilizado este modelo animal para estudiar la implicación de los receptores CB1 de los islotes pancreáticos en las posibles alteraciones que se producen en determinadas vías de señalización intracelular como la de AKT, CREB, AMPK y mTORC1, y en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) durante el desarrollo de la diabetes.

Asimismo, hemos estudiado la participación de dichas vías de señalización en las

acciones mediadas por los receptores CB1 y GPR55 en islotes pancreáticos aislados de ratones sanos e islotes humanos de donantes no diabéticos, y se ha investigado el papel de estos receptores en los procesos de secreción de insulina, producción de ROS y apoptosis, procesos todos ellos que acaban siendo alterados en la diabetes tipo 2.

5.1.1 Expresión de los receptores CB1 y GPR55 en islotes pancreáticos

Es conocido que tanto los receptores cannabinoides CB1 como el receptor GPR55 están presentes en islotes pancreáticos de ratón (Juan-Picó *et al.*, 2006; Starowicz, 2008; Nakata *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010; Romero-Zerbo *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2016) y de humanos (Bermúdez-Silva *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2016). En esta tesis hemos confirmado la expresión en islotes pancreáticos de estos receptores y además hemos investigado la expresión de CB1 en ratones pre-diabéticos. Nuestros resultados en este contexto son preliminares, ya que deberíamos completarlos a través de otros estudios más detallados que incluyan una cuantificación más exhaustiva de este receptor como por ejemplo ensayos de qPCR, pero apuntan a una sobre-expresión proteica de CB1 en los islotes de ratones pre-diabéticos (**Fig. 3C-D**), lo cual está de acuerdo con resultados publicados recientemente (González-Mariscal *et al.*, 2016) que muestran una mayor expresión de CB1 a nivel de mRNA en islotes humanos de donantes con un índice de masa corporal (BMI) mayor de 30 con respecto a aquellos con BMI menor a 30, y con las evidencias que apuntan a una sobre-activación del sistema endocannabinoide en obesidad y diabetes (Matias *et al.*, 2006).

Como se ha comentado anteriormente, al igual que el receptor cannabinode CB1, el receptor GPR55 también se expresa en islotes pancreáticos de ratones (Romero-Zerbo *et al.*, 2011; Mckillop *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2016) y también se han detectado niveles de mRNA y de proteína de este receptor en islotes humanos (Li *et al.*, 2011 y Liu *et al.*, 2016, respectivamente). Nuestros resultados de Western blot corroboran la expresión del receptor GPR55 en islotes pancreáticos, así como en otros tejidos como cerebro e hígado (**Fig. 3B**).

También sería interesante evaluar, en estudios posteriores, la expresión de GPR55 en islotes de ratones pre-diabéticos, ya que al igual que el receptor CB1, podría estar alterada, coincidiendo con otros estudios donde GPR55 parece estar sobreexpresado en el tejido adiposo de sujetos obesos y especialmente en individuos obesos y con diabetes tipo 2, cuya expresión de GPR55 se correlaciona con el peso corporal, BMI y el porcentaje en grasa (Moreno Navarrete *et al.*, 2012).

5.1.2 Modulación de las vías intracelulares AKT, CREB y AMPK por CB1

En relación a la participación de las vías de señalización intracelular Akt, CREB, y AMPK en las acciones mediadas por CB1 y relacionadas con la respuesta a la glucosa, tanto en islotes de animales sanos como de animales pre-diabéticos, se llevaron a cabo experimentos *in vivo* en los que los ratones fueron inyectados con rimonabant y seguidamente desafiados con una sobrecarga de glucosa (véase el apartado 3.6 de materiales y métodos). Posteriormente, se extrajeron los páncreas y se aislaron los islotes pancreáticos, analizando por Western blot los niveles de las proteínas fosforiladas Akt, CREB y AMPK, junto a los niveles de las proteínas no fosforiladas y la β -actina. También se realizaron experimentos *in vitro*, donde los islotes aislados de ratones de la cepa CD-1 e islotes humanos fueron tratados con el antagonista de CB1, LH-21, en condiciones de alta y media concentración de glucosa (véase apartado 3.7 de materiales y métodos).

Los resultados de los experimentos realizados *in vivo* muestran que el bloqueo de CB1 con rimonabant en ratones controles disminuyó la fosforilación de Akt (**Fig. 4A**) e incrementó las de CREB y AMPK (**Fig. 6A, 8A**) respecto a los valores obtenidos en islotes de estos animales tratados sólo con vehículo, sugiriendo que CB1 juega un papel en el normal funcionamiento de todas estas vías de señalización en los islotes durante la respuesta a glucosa. Por su parte, la condición pre-diabética indujo cambios en la fosforilación de estas proteínas, que no siendo significativos, tienden a comportarse cualitativamente de la misma forma que en presencia del rimonabant, aunque la magnitud de los cambios observados es menor. Esto sugiere que, al menos en el modelo animal de pre-diabetes utilizado, las vías de señalización en la que estas proteínas están implicadas se ven poco afectadas en respuesta a la glucosa (**Fig. 4A, 6A y 8A**). El bloqueo con rimonabant de CB1 en islotes de animales pre-diabéticos manifiesta pocos cambios en la fosforilación de las proteínas estudiadas, lo que llevaría a sugerir que la modulación ejercida por CB1 de las vías a la que estas proteínas pertenecen no se produce o está muy atenuada en la situación de pre-diabetes.

Según los resultados de los experimentos realizados *in vitro* en islotes de ratones sanos, tratados con LH-21, este antagonista neutro de los receptores cannabinoides CB1, también alteró la fosforilación de las proteínas Akt, CREB y AMPK. En concreto, en condiciones de alta glucosa, este ligando cannabinoide también disminuyó la fosforilación de Akt, e incrementó la fosforilación del factor de transcripción CREB, al igual que lo hizo el rimonabant (**Fig. 4B y 6B**). En cambio, LH-21 disminuyó la

fosforilación de la proteína AMPK, efecto opuesto al observado con el rimonabant en nuestros experimentos *in vivo* (**Fig. 8B**).

Con respecto a Akt, cuya activación estimula supervivencia y proliferación en islotes pancreáticos (Elghazi *et al.*, 2007), experimentos genéticos y farmacológicos previos realizados en islotes pancreáticos de ratón han mostrado que tanto la carencia de CB1 como su bloqueo farmacológico con AM251 incrementan la fosforilación de Akt, y la estimulación de CB1 con ACEA inhibe dicha fosforilación en un modo dependiente de señalización a través del receptor de insulina (Kim *et al.*, 2011). Además, el bloqueo de CB1 lleva a incrementos de la proliferación y de la masa de células β y, en ratones diabéticos *db/db*, a una disminución de la glucosa sanguínea e incremento en la proliferación y la masa de células β (Kim *et al.*, 2011). Por tanto, podría pensarse que el bloqueo de CB1 tendría efectos beneficiosos sobre los islotes pancreáticos en la condición diabética. Estos resultados son parcialmente contrapuestos a los obtenidos por nosotros en islotes de ratón. Las diferencias entre lo publicado en modelos animales de diabetes y nuestros resultados, podrían deberse a que el modelo que estudiamos no es propiamente un modelo de diabetes, sino de pre-diabetes; esto es, un estado inmediatamente anterior a la misma, donde todas las alteraciones moleculares observables en ella no han tenido aún lugar. Asimismo, las diferencias entre nuestros resultados de fosforilación de Akt en islotes de ratones y los publicados por el grupo de la Dra. Egan (González Mariscal *et al.*, 2016) podrían tener relación con el uso de diferentes moléculas para hacer diana en el SEC, ya que tanto rimonabant como LH-21, usados por nosotros pero no en el estudio de la Dra. Egan, podrían tener una acción inespecífica, actuando sobre otros receptores como, por ejemplo, GPR55 (Kapur *et al.*, 2009; Yin *et al.*, 2009). Por tanto, nuestros resultados podrían tener también relación con acciones extra-CB1 llevadas a cabo por el rimonabant y LH-21. Sin embargo, nuestros resultados en islotes pancreáticos humanos están de acuerdo con los publicados por la Dra. Egan (véase más adelante). Además, es conveniente hacer notar que los resultados que hemos obtenido en ratones complementan y van en la misma línea de los que existen en la bibliografía para otros tejidos. Por ejemplo, la activación de los receptores cannabinoides CB1 en el sistema nervioso central (hipocampo, núcleo estriado y cerebro) aumentaron la fosforilación de Akt en ratones (Ozaita *et al.*, 2007), y el tratamiento con rimonabant en adipocitos redujo la fosforilación de Akt (Wang *et al.*, 2015).

Con respecto a CREB, el tratamiento con rimonabant incrementó su fosforilación (**Fig. 6A**) en islotes pancreáticos de ratones sanos alimentados con la dieta control. En islotes de ratones diabéticos no se detectaron cambios estadísticamente significativos.

Por tanto, en lo que concierne a CREB, nuestros resultados sugieren que rimonabant induce el crecimiento celular en islotes pancreáticos de ratones controles pero no en islotes de ratones pre-diabéticos, lo que indica una alteración en la capacidad del receptor CB1 para modular el factor de transcripción CREB en estos animales pre-diabéticos. Los resultados que hemos obtenido, tras la estimulación *in vivo* con rimonabant, sobre el incremento en la fosforilación de CREB, concuerdan con los que hemos hallado empleando el antagonista de CB1 LH-21 en experimentos *in vitro* en situación de alta glucosa. Estos resultados podrían interpretarse en base a la propia naturaleza de los receptores cannabinoides CB1 como receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas inhibitorias ($G_{i/o}$). Cuando estos receptores se activan, se produce una inhibición del enzima adenilato ciclasa, lo que disminuye la concentración de $cAMP$, y así también, la actividad de quinasas que fosforilan, entre otras proteínas, a CREB. Dado que el rimonabant inhibe al receptor cannabinoide CB1, los niveles de $cAMP$ se mantendrían altos lo que permitiría incrementar la tasa de fosforilación de CREB, y con ello, su actividad como factor de transcripción. Estos resultados no concuerdan con los publicados por otros autores realizados en cerebelo e hipocampo de ratas, los cuales, muestran que es la activación de los receptores cannabinoides la que incrementa la fosforilación de CREB y no la inhibición de los mismos. Así, ciertos endocannabinoides incrementaron la fosforilación de CREB, siendo este efecto suprimido tras el tratamiento con rimonabant (Casu *et al.*, 2005; Isokawa, 2009). Una posible explicación a estas discrepancias podría ser que la modulación ejercida por el rimonabant sobre la fosforilación de CREB fuese dependiente de la especie y del contexto tisular donde ejerce su acción. Alternativamente, de nuevo no podemos descartar que rimonabant y LH-21, para modular la vía CREB, puedan ejercer acciones sobre otros receptores como GPR55, receptor expresado en los islotes pancreáticos. Existen en la literatura científica trabajos que demuestran que ciertos antagonistas de CB1 (distintos a los que en esta tesis se han utilizado), causan incrementos en la proliferación y la masa de las células β (Kim *et al.*, 2011); pero en nuestro conocimiento, no existen trabajos donde se haya investigado la posible modulación del factor de transcripción CREB por CB1 en los islotes pancreáticos. En este sentido, nuestros resultados serían los primeros que apuntan a que CREB podría estar implicado en el incremento en la proliferación y masa de células β que se observa tras el tratamiento de los islotes con antagonistas de CB1.

Con respecto al sensor metabólico AMPK, el tratamiento *in vivo* con rimonabant incrementó la fosforilación de la proteína AMPK (**Fig. 8A**) en islotes pancreáticos de ratones alimentados con la dieta control. En los islotes de ratones pre-diabéticos, sin embargo, no se detectaron cambios estadísticamente significativos, aunque sí una tendencia a incrementar la fosforilación de AMPK. En relación a lo anterior, podría afirmarse que el incremento de fosforilación de AMPK observado en islotes de ratones alimentados con la dieta control, estimularía la generación de ATP por la activación de enzimas claves en el control de rutas catabólicas como la glucólisis ó la β -oxidación de ácidos grasos y reprimiría rutas anabólicas. En este sentido, datos de otros autores han mostrado que el rimonabant induce la fosforilación de AMPK en líneas celulares derivadas de hepatocitos humanos inhibiendo la lipogénesis (Wu *et al.*, 2011). De producirse los cambios metabólicos comentados en islotes procedentes de ratones pre-diabéticos sin duda lo harían con tasas mucho más bajas.

Al contrario que con el rimonabant, nuestros experimentos *in vitro* de bloqueo de los receptores cannabinoides CB1 con LH-21 muestran que se produce no un aumento, sino una disminución de la fosforilación de la proteína AMPK en islotes de ratones. La explicación del porqué de estas discrepancias entre experimentos *in vivo* e *in vitro* no son fáciles de establecer y requerirían de un estudio más detallado; si bien, es claro que el entorno de una célula de un islote *in vitro* no es el mismo que tiene *in vivo* al carecer de irrigación sanguínea y del normal control neuro-endocrino. Estas importantes circunstancias, podrían afectar a la modulación de las señales transmitidas por antagonistas cannabinoides y a las rutas de señalización implicadas en la misma. No sería descartable tampoco que las diferencias observadas fueran debidas a efectos extra-CB1 de alguno de los ligandos cannabinoides utilizados. Resultados como los nuestros, que muestran disminución de la fosforilación de AMPK cuando los islotes son tratados con el antagonista de CB1 LH-21 serían desde un punto de vista argumental compatibles con los obtenidos por otros autores que han estudiado el efecto de agonistas sintéticos de receptores cannabinoides en relación a la activación de la proteína AMPK en algunos cánceres pancreáticos (Dando *et al.*, 2013). En estos estudios, se muestra que estos agonistas sintéticos de receptores cannabinoides parecen activar AMPK induciendo autofagia en las células del tumor. Es bien conocido que en la obesidad y en la diabetes tipo 2 existen niveles elevados de endocannabinoides (Matias *et al.*, 2006). Como hemos comprobado en nuestros experimentos, los islotes de los ratones de animales pre-diabéticos (aquellos a los que se les suministró una dieta 45% en grasa) la proteína AMPK se encuentra activada (20% aprox.) respecto a los de controles sanos (alimentados con dieta 10% en grasa) (**Fig. 8A**). Esta activación podría ser responsable del desencadenamiento de

fenómenos de autofagia que ocasionarían la muerte de la célula β y la disminución de la masa celular de los islotes. Dados estos antecedentes, podría especularse que LH-21 podría ser un buen candidato farmacológico a la hora de tratar de minimizar estos efectos adversos sobre la población de islotes pancreáticos.

Con respecto a los experimentos realizados en islotes humanos, el bloqueo de los receptores cannabinoides CB1 en islotes pancreáticos tratados *in vitro* con LH-21, incrementó notablemente la fosforilación de AKT (**Fig. 5A** y **5B**), en lugar de disminuirla, como habíamos visto en islotes de ratones con ese compuesto y también con rimonabant *in vivo*. Como puede observarse en los experimentos que hemos realizado de secreción dinámica de insulina empleando islotes pancreáticos humanos tratados con LH-21 en perfusión (**Fig. 20A**), este ligando cannabinoide incrementa de forma dosis dependiente la producción de insulina. En este sentido, los efectos del aumento de fosforilación de AKT provocados por LH-21 serían consecuencia directa del aumento de insulina causado por este fármaco y de los efectos modulares que este enzima tiene sobre la activación de la ruta PI3K/AKT. Nuestros resultados en islotes humanos están de acuerdo con los resultados previos realizados con islotes murinos reportados por el grupo de la Dra. Egan, discutidos anteriormente. Por otro lado, LH-21 no alteró los niveles de fosforilación de CREB ni de AMPK en islotes humanos (**Fig. 7** y **9**). Los diferentes efectos que se observan cuando se emplean islotes pancreáticos humanos, respecto a los obtenidos con islotes de ratón indican que existen claras diferencias inter-especie en la modulación por CB1 de rutas de señalización estudiadas. Este hecho lleva también a subrayar que no es posible extrapolar de manera directa los resultados obtenidos con islotes de ratón al humano y que éstos deberían ser validados en islotes humanos para extraer conclusiones que sean de utilidad.

En resumen, como se ha discutido en este apartado, CB1 modula las vías de señalización AKT, CREB y AMPK en islotes pancreáticos, sugiriendo que parte de los efectos beneficiosos reportados para el bloqueo de CB1 en islotes podría estar mediado por estas vías, especialmente los relacionados con el papel de AKT y CREB en el incremento de la masa de células β . Además, la respuesta a la manipulación farmacológica de CB1 es diferente en islotes de ratones pre-diabéticos, lo que sugiere que estos receptores podrían jugar algún papel en la fisiopatología de la diabetes tipo 2.

Por otro lado, y dadas las reiteradas diferencias inter-especie encontradas, es necesario remarcar la conveniencia de realizar estudios en islotes humanos, tanto

procedentes de sujetos diabéticos como no diabéticos, para validar los resultados que se obtengan en islotes de roedores, así como utilizar diversos agonistas y antagonistas de CB1, con vistas a determinar sin ambigüedad cuál es el papel real de CB1 en la modulación de estas vías intracelulares, para esclarecer su posible participación en la patogénesis y en la fisiopatología de la diabetes tipo 2 humana.

Finalmente, no podemos descartar que parte de los efectos observados con rimonabant o LH-21 estén mediados a través de otros receptores, como GPR55, dado que se han descrito acciones de estas moléculas a través de este receptor (Ruz-Maldonado *et al.*, 2015; Henstridge *et al.*, 2010).

5.1.3 Modulación de las vías intracelulares AKT, CREB y AMPK por GPR55

Junto a CB1, en la presente tesis doctoral hemos estudiado la capacidad de GPR55 para modular las vías de señalización AKT, CREB y AMPK en islotes pancreáticos de ratones sanos y de humanos. Para ello, se han realizado experimentos *in vitro* con el agonista selectivo de este receptor, Abn-CBD.

Abn-CBD moduló las tres vías de señalización indicadas en islotes de ratón y solamente la vía AKT en islotes humanos. Estos resultados sugieren que el ligando endógeno de GPR55, LPI, podría utilizar estas vías de señalización para producir sus efectos biológicos. En concreto, Abn-CBD en islotes murinos disminuyó la fosforilación de Akt (**Fig. 4C**) e incrementó la fosforilación de CREB y AMPK (**Fig. 6C y 8C**), mientras que en islotes humanos aumentó la fosforilación de AKT (**Fig. 5**) y no alteró a las proteínas CREB y AMPK (**Fig. 7 y 9**). Por tanto, GPR55 en islotes murinos y de humanos podría jugar un papel en procesos mediados por AKT, tales como la proliferación celular y la regulación de la masa de las células β . De hecho, GPR55 ha sido previamente reconocido como un receptor implicado en los procesos proliferativos y en las alteraciones que se producen en éstos en determinadas enfermedades como el cáncer (Andradas *et al.*, 2011). Adicionalmente, en islotes de ratón también podría modular estos procesos a través de CREB, y, regulando negativamente la secreción de insulina a través de AMPK, como hemos visto en experimentos de secreción estática de insulina.

Existen algunos trabajos que relacionan a los receptores GPR55 con la señalización mediada a través de la proteína Akt. Así, algunos autores han observado cómo Abn-CBD aumenta la fosforilación de Akt en líneas celulares HUVEC a través de mecanismos independientes de los receptores cannabinoides CB1 y CB2 (Offertáler *et al.*, 2003; Mo *et al.*, 2004). Otros estudios han mostrado la implicación de GPR55 en

las propiedades migratorias de células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo (MSC) estimulada por cannabidiol (CBD), sugiriendo que su papel modulador pudiera ejercerse a través del control que la proteína Akt fosforilada ejerce sobre la fosforilación a su vez, de la quinasa activada por mitógeno (MAPK) p42/44 (Schmuhl *et al.*, 2014). Ha podido demostrarse también que las propiedades pro-angiogénicas demostradas por el análogo endocannabinoide N-araquindoilserina (ARA-S) están mediadas, al menos en parte, por la activación de GPR55. ARA-S, a través de GPR55, modula la angiogénesis incrementando, entre otros factores, la fosforilación de Akt (Ho, 2010).

Con respecto al factor de transcripción CREB, se ha comprobado que LPI, AM251 y rimonabant incrementaron su fosforilación en células HEK293 (Henstridge *et al.*, 2010), pero, no existen publicaciones que relacionen al receptor GPR55 con la señalización a través de AMPK. Además, ninguno de estos estudios se ha realizado en islotes pancreáticos, ni se han vinculado con la fisiopatología de la diabetes tipo 2. Por tanto, en nuestro conocimiento, los resultados presentados en esta tesis constituyen la primera evidencia de modulación de estas vías de señalización a través de GPR55. No obstante, sería conveniente recordar que Abn-CBD se ha relacionado también con GPR18 (McHugh *et al.*, 2010; Console-Bram *et al.*, 2014), por lo que no podemos excluir que parte o la totalidad de los efectos que ejerce Abn-CBD sobre la modulación de estas vías en los islotes puedan estar mediados por GPR18. Además, el transcrito de GPR18 ha sido detectado en páncreas (Rajaraman *et al.*, 2016).

Asimismo, al igual que ocurría para CB1, de nuevo se observan diferencias entre los resultados obtenidos con islotes murinos y humanos, sugiriendo diferencias inter-especie en las vías de señalización que son reclutadas tras la activación de GPR55. Este hecho, remarca la necesidad de usar también islotes humanos para validar GPR55 como posible diana terapéutica para la diabetes tipo 2.

5.2 RECEPTORES CB1 Y GPR55 EN LA SECRECIÓN DE INSULINA ESTIMULADA POR GLUCOSA

En la presente tesis doctoral también se analizó el efecto de rimonabant, LH-21 y Abn-CBD en la secreción de insulina estimulada por glucosa en islotes pancreáticos de ratones (de las cepas ICR y C57BL/6J WT y C57BL/6J GPR55^{-/-}) y de humanos no diabéticos. Se realizaron experimentos de medida de la movilización del Ca²⁺ intracelular, secreción estática de insulina así como experimentos de secreción

dinámica de insulina mediante técnicas de perfusión (véase los apartados 3.9, 3.10 y 3.12 de materiales y métodos respectivamente).

Pese a estar confirmada en la literatura la expresión de CB1 en las células β de los islotes pancreáticos, tanto de roedores como de humanos (Bermúdez-Silva *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011; González-Mariscal *et al.*, 2016), no está claro aún cuál es el efecto sobre la secreción de insulina que tiene CB1 tras su activación o bloqueo. Mientras la mayoría de estudios apuntan a que la estimulación de CB1 incrementa la secreción de insulina y su bloqueo la disminuye (Matias *et al.*, 2006; Bermúdez-Silva *et al.*, 2008; Getty-Kaushik *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010; Bermúdez-Silva *et al.*, 2016), otros, van en dirección contraria (Nakata *et al.*, 2008; González-Mariscal *et al.*, 2016). Sin duda, diversos factores tales como la naturaleza del agonista/antagonista usado, las concentraciones de los mismos utilizadas, o cambios en el diseño experimental, están jugando un papel importante en estas discrepancias.

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral muestran que rimonabant disminuye la secreción de insulina en experimentos de secreción estática en islotes de ratones C57BL/6J sanos (**Fig. 14A**), y que LH-21 muestra el mismo efecto en islotes de ratones ICR y en islotes humanos (**Fig. 17**), aunque no en islotes de ratones C57BL/6J donde LH-21 no parece tener efecto (**Fig. 15A**). En general, estos resultados están de acuerdo con la mayoría de experimentos de secreción estática de insulina publicados en relación a los receptores CB1 (Matias *et al.*, 2006; Bermúdez-Silva *et al.*, 2008; Getty-Kaushik *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010; Bermúdez-Silva *et al.*, 2016). Es conveniente hacer notar que en la bibliografía no hay datos que relacionen LH-21 con la secreción de insulina en islotes pancreáticos. Nuestros resultados con rimonabant en islotes de animales pre-diabéticos (**Fig. 14B**) muestran una tendencia a disminuir la secreción de insulina, de acuerdo a experimentos previos realizados con islotes de ratas obesas (Getty-Kaushik *et al.*, 2009).

Es bien conocido que las movilizaciones del Ca^{2+} intracelular están acopladas a la secreción de insulina en los islotes pancreáticos, de modo que cuanto mayor es la movilización del Ca^{2+} , mayor es también la secreción de insulina (Nadal *et al.*, 1999). Por ello, quisimos también investigar los flujos de Ca^{2+} en presencia de alta glucosa y de antagonistas de CB1, utilizando para estos experimentos LH-21. Nuestros resultados muestran que LH-21 incrementó la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, tanto en islotes pancreáticos de ratones C57BL/6J como de humanos (**Figs. 11A y 13**). Estos resultados llevarían a esperar un incremento en la secreción de insulina en presencia de LH-21, algo que no se observó en los experimentos de secreción estática (**Figs. 15A y 17**), aunque sí, en

nuestros experimentos de secreción dinámica (**Figs. 18B-C y 20A**). Nuestros experimentos de secreción dinámica de insulina concuerdan también con los publicados por otros grupos como el de la Dra. Egan, quien utilizó rimonabant y JD-5037. Este último compuesto, es un agonista inverso de CB1 con baja permeabilidad a través de la barrera hematoencefálica (González-Mariscal *et al.*, 2016).

Las diferencias en las medidas de secreción de insulina encontradas llevando a cabo experimentos estáticos o dinámicos podrían residir en la naturaleza propia de ambos diseños experimentales. En los experimentos de medida de insulina estáticos, los islotes se incuban en un medio al que se añaden los fármacos y tras un tiempo de incubación, se analiza la producción de insulina en el medio de secreción. Es muy probable que en estas condiciones, además de insulina puedan acumularse en el medio otros metabolitos y hormonas como la somatostatina y/o el ácido γ -aminobutírico que podrían ejercer efectos paracrinis inhibitorios sobre la producción de insulina liberada al medio desde los islotes (véase **Fig. 5** apartado de introducción). En los experimentos de secreción dinámica, en cambio, estos efectos no se producen ya que el medio fluye continuamente, entrando y saliendo del sistema de perfusión. La propia naturaleza del ensayo hace que la acción sobre la producción de insulina tras la adición de fármacos pueda medirse de manera mucho más específica y precisa, eliminándose efectos no deseados y las interferencias causadas por el acúmulo de metabolitos interferentes (Li *et al.*, 2011).

Por tanto, podría concluirse que tanto LH-21 como rimonabant tienen un efecto directo sobre los islotes pancreáticos, modulando la secreción de insulina. Teniendo en cuenta que los experimentos de secreción dinámica de insulina constituyen un diseño experimental más próximo a la situación *in vivo*, cabría pensar que la acción fisiológica de estas moléculas sería la de favorecer el incremento de la secreción de insulina, lo que teóricamente ayudaría a mejorar el control de la glucosa plasmática. Sin embargo, no podemos olvidar las limitaciones técnicas del modelo, como son el uso de islotes aislados, desprovistos de inervación y del *input* de factores provenientes de otros tejidos.

Por otro lado, varios estudios han mostrado que antagonistas del receptor cannabinoide CB1, como AM251 y rimonabant, pueden actuar como agonistas de GPR55 (Kapur *et al.*, 2009). De hecho, la activación de GPR55 incrementa la secreción de insulina en islotes aislados (Romero-Zerbo *et al.*, 2011; McKillop *et al.*, 2013; McKillop *et al.*, 2016). Por ello, quisimos investigar la posible implicación de GPR55 en los efectos causados por LH-21, para lo cual, utilizamos islotes procedentes de ratones

transgénicos C57BL/6J GPR55^{-/-}, que fueron tratados con diferentes concentraciones de LH-21. Nuestros resultados (**Figs. 11, 15 y 18B-C**) muestran que en los islotes de estos ratones carentes de la expresión de GPR55, no se moviliza Ca²⁺ y ni se produce insulina a las dosis más bajas ensayadas de LH-21, 1nM-100nM. Por tanto, puede afirmarse que al menos parte de los efectos provocados por LH-21 sobre la secreción de insulina en los islotes pancreáticos están mediados por GPR55, en lugar de CB1 como inicialmente podría pensarse (Ruz-Maldonado *et al.*, 2015). Teniendo en cuenta todo lo expuesto, se debería concluir que habría que ser cauto a la hora de asignar los efectos de rimonabant y LH-21 a una acción mediada por CB1, cuando las evidencias apuntan a que al menos parte de estos efectos pueden estar siendo mediados por GPR55.

En esta tesis doctoral también quisimos investigar el papel de GPR55 en la secreción de insulina estimulada por glucosa. Para ello, utilizamos el agonista de GPR55 mejor caracterizado hasta la fecha, el Abn-CBD. Nuestro grupo de investigación fue el primero en describir la participación de GPR55 en la fisiología de la célula β pancreática, demostrando la expresión de GPR55 en islotes de rata y ratón, así como el incremento en la secreción de insulina tras su activación por O-1602 (otro agonista de GPR55), efecto que desaparecía en islotes de ratones KO de GPR55 (Romero-Zerbo *et al.*, 2011). Trabajos posteriores han mostrado que Abn-CBD también aumenta la secreción de insulina en otras células como las BRIN-BD11 además de en islotes pancreáticos de ratones (McKillop *et al.*, 2013; McKillop *et al.*, 2016).

Sin embargo, en nuestros experimentos de secreción estática de insulina, Abn-CBD no produjo ningún efecto en islotes de ratones ICR (**Fig. 17A**) ni en los de C57BL/6J (**Fig. 16**), y disminuyó la secreción de insulina en islotes humanos (**Fig. 17B**). Estos resultados son contradictorios con lo publicado (McKillop *et al.*, 2013; McKillop *et al.*, 2016). Ahora bien, en los experimentos de medida del Ca²⁺ intracelular en islotes de ratón, Abn-CBD, incrementó a 10 μ M la movilización de Ca²⁺ (**Fig. 12A**), un efecto que no se observa en los islotes de ratones C57BL/6J GPR55^{-/-} (**Fig. 12B**), por lo que debe estar mediado por GPR55.

Además, en los experimentos de secreción dinámica de insulina Abn-CBD incrementó significativamente la secreción de insulina en islotes murinos (**Fig. 19**) y en islotes humanos (**Fig. 20B**), no apreciándose dicho efecto a la dosis de 10 μ M en islotes de ratones C57BL/6J GPR55^{-/-} (**Fig. 19B**). El efecto en islotes humanos fue claramente dosis-dependiente. Por tanto, cabe concluir que Abn-CBD incrementa la secreción de insulina en islotes de ratón y de humanos, siendo, al menos el efecto en ratones,

mediado por GPR55.

En relación a los resultados de los experimentos de secreción dinámica empleando Abn-CBD en islotes de ratones C57BL/6J WT y C57BL/6J GPR55^{-/-}, resulta llamativo que a 10μM el efecto parece dependiente del receptor GPR55 (**Fig. 19B**) mientras que a menor concentración (1μM), el efecto sobre la secreción de insulina se observa tanto en islotes de C57BL/6J WT como en los de C57BL/6J GPR55^{-/-}, de lo que habría que concluir que Abn-CBD media también efectos independientes de GPR55 (**Fig. 19A**). Una posible explicación a este hecho es que Abn-CBD pudiera estar actuando a bajas concentraciones a través de otro receptor, como GPR18, el cual también ha sido implicado en las acciones de Abn-CBD (Console-Bram *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2013).

Por tanto, nuestros resultados confirman un papel de Abn-CBD a través de GPR55 en la secreción de insulina estimulada por glucosa, así como posibles efectos extra-GPR55 que también son estimulatorios de la secreción de insulina. Estos efectos de Abn-CBD están también presentes en islotes humanos, lo que sugiere que esta molécula podría constituir una nueva herramienta farmacológica para luchar contra la diabetes tipo 2.

5.3 INTERACCIÓN ENTRE LOS RECEPTORES CANNABINOIDES CB1 Y LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN mTORC1

Junto al estudio de la modulación de las vías de señalización Akt, CREB y AMPK por parte de CB1, también ha sido objeto de análisis la vía mTORC1 en la presente tesis doctoral. De hecho, parte de estos resultados han sido recientemente publicados (Bermúdez-Silva *et al.*, 2016). mTORC1 es un complejo multiproteico sensible a rapamicina y que funciona como un sensor nutricional capaz de integrar señales procedentes de factores de crecimiento y de hormonas a través de las vías PI3K-Akt (Laplante *et al.*, 2012). mTORC1 regula la síntesis de proteínas y diferentes aspectos del metabolismo y el crecimiento celular, principalmente a través de la quinasa p70S6K1 y de la proteína de unión 1 al factor de iniciación 4E de la traducción eucariota (4EBP1) (véase el apartado 1.6 de la introducción).

Al igual que CB1, la vía mTORC1 está implicada en la fisiología de la célula β (revisado en Leibowitz *et al.*, 2008). La activación transitoria de mTORC1 lleva a incrementos en el tamaño del islote pancreático, de la masa de células β y de la producción de insulina (Blandino-Rosano *et al.*, 2012), efectos fisiológicos similares a los descritos para el bloqueo de CB1 (Kim *et al.*, 2011).

Por ello, y dados los antecedentes de la relación entre CB1 y mTORC1 en otros tejidos (Puighermanal *et al.*, 2009), uno de los proyectos de investigación financiados a nuestro grupo tenía como propósito investigar la posible conexión molecular de ambas vías de señalización en islotes pancreáticos y, en concreto, con la capacidad para modular la secreción de insulina.

El tratamiento *in vitro* de islotes pancreáticos con rimonabant incrementó la fosforilación de la quinasa p70S6K1, diana del complejo proteico mTORC1, un efecto que fue revertido por la pre-incubación con rapamicina (inhibidor selectivo de mTORC1) (**Fig. 10B**). Por tanto, nuestros resultados sugieren que el bloqueo de CB1 incrementa la activación de la vía, participando ésta en las acciones fisiológicas mediadas por CB1. Este podría ser el mecanismo por el cual el bloqueo de CB1 induce proliferación e incremento de la masa de células β (Kim *et al.*, 2011; Bermúdez-Silva *et al.*, 2016). Además, hemos comprobado que mTORC1 participa en la modulación de la secreción de insulina que ejerce CB1, puesto que la disminución producida por rimonabant en islotes pancreáticos aislados, en experimentos de secreción estática, es dependiente de la existencia de una vía mTORC1 funcional. El bloqueo de dicha vía con rapamicina eliminó el efecto de rimonabant sobre la secreción de insulina (**Fig. 14A**).

También hemos estudiado la activación de mTORC1, mediante la cuantificación de la fosforilación de p70S6K1, en islotes pancreáticos de ratones sanos y pre-diabéticos inyectados de manera aguda con rimonabant. Los islotes procedentes de animales pre-diabéticos mostraron una mayor fosforilación de p70S6K1, compatible con una activación de la vía mTORC1 para promover un incremento de la masa de células β (**Fig. 10A**). Sin embargo, tanto en los islotes de animales sanos como de pre-diabéticos, rimonabant disminuyó la fosforilación de p70S6K1, sugiriendo una menor activación de la vía mTORC1. Esto resulta contrario a lo observado en islotes pancreáticos tratados *in vitro* con rimonabant (**Fig. 10B**). Estas diferencias podrían surgir de interferencias causadas por las interacciones que el fármaco puede tener con otros de sus tejidos diana cuando es administrado *in vivo*, respecto a cuando es añadido al medio *in vitro*, donde estos efectos no se producen.

También estudiamos la participación de mTORC1 en la modulación ejercida por CB1 sobre la secreción de insulina en islotes procedentes de ratones pre-diabéticos. Nuestros resultados muestran que rimonabant tendió a disminuir la secreción de insulina, de manera similar al efecto observado en islotes de ratones sanos, aunque no se alcanzó la significación estadística (**Fig. 14B**). Además, la preincubación con

rapamicina no bloqueó el efecto de rimonabant, sugiriendo una desconexión entre las vías de señalización por CB1 y la vía mTORC1 en la pre-diabetes (**Fig. 14B**).

A modo de resumen, podemos concluir que el bloqueo de los receptores cannabinoides CB1 con rimonabant disminuyó la GSIS y aumentó *in vitro* la actividad de la diana de mTORC1, p70S6K1, en islotes pancreáticos de ratones WT, sugiriendo así la implicación de mTORC1 en las acciones fisiológicas de CB1 y, a su vez, la participación de CB1 en los fenómenos de aumento de la proliferación y masa de células β promovidos por mTORC1. Por tanto, ambas vías parecen estar funcionalmente conectadas en los islotes pancreáticos (Bermúdez-Silva *et al.*, 2016). Además, la actividad de este complejo proteico también se encuentra incrementada en los islotes de los ratones pre-diabéticos, pudiendo afectar negativamente a la señalización de la insulina a través del feedback negativo que ejerce sobre los IRS, aunque los efectos de CB1 sobre la secreción de insulina dejan de ser dependientes de mTORC1, sugiriendo que esta alteración en la conexión CB1-mTORC1 puede jugar un papel en la fisiopatología de la diabetes tipo 2.

5.4 LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS) EN ISLOTES PANCREÁTICOS Y EL RECEPTOR CANNABINOIDE CB1

Con vistas a estimar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), los niveles de anión superóxido en islotes fueron cuantificados por microscopia confocal, usando el método del dihidroetidio (ver apartado 3.14 de materiales y métodos). Los niveles de ROS han sido investigados tras el tratamiento *in vitro* con ligandos cannabinoides, en islotes pancreáticos de rata y ratón. Las ratas empleadas en este estudio fueron ratas Wistar y los ratones se correspondían con la cepa C57BL/6J. También se ha evaluado la producción de ROS en islotes pancreáticos aislados de ratones pre-diabéticos y ratones controles.

Nuestros resultados muestran que, en condiciones de estimulación aguda con alta concentración de glucosa, el contenido de ROS en islotes pancreáticos de rata (**Fig. 21**) y de ratón (**Fig. 23**) fue menor que en condiciones de baja concentración de glucosa. Por otro lado, de manera similar los islotes de los animales pre-diabéticos mostraron un menor contenido en ROS que los islotes de animales controles (**Fig. 25**). Otros autores han encontrado un resultado similar en islotes pancreáticos de ratas obesas alimentadas también con una dieta alta en grasa (Valle *et al.*, 2011). En contraste, estudios en modelos de glucotoxicidad y en islotes de ratas diabéticas han puesto de

manifiesto un incremento de ROS y del daño oxidativo (Tanaka *et al.*, 2002; Bindokas *et al.*, 2003). Las diferencias entre lo observado en estudios agudos o islotes procedentes de modelos de pre-diabetes (nuestros experimentos) con respecto a ensayos de glucotoxicidad o islotes de animales diabéticos pueden tener relación con la intensidad del daño glucotóxico. En nuestros experimentos, la menor cantidad de ROS detectada puede deberse a una eficiente actividad de los mecanismos para contrarrestar el exceso de ROS en respuesta a alta glucosa, tanto en islotes procedentes de animales sanos estimulados de manera aguda con glucosa como en islotes de animales pre-diabéticos, mientras que modelos que usan una estimulación continua de glucosa o islotes muy dañados por la condición diabética pueden ser incapaces de contrarrestar ese daño, observándose un incremento en ROS.

Con respecto a los mecanismos que pueden estar provocando la disminución de ROS en nuestros experimentos, estudios recientes han demostrado que el nivel de ROS inducido por glucosa está relacionado directamente con la actividad de la ruta de las pentosas fosfato. Así, los niveles de ROS descienden cuando la actividad de esta vía metabólica se incrementa (Lenzen, 2008). Un incremento en la actividad de la ruta de las pentosas fosfato conduce a un aumento del nivel de NADPH, lo que permite a su vez mantener niveles elevados de glutatión reducido (GSH), la principal molécula antioxidante de la célula β (Rebelato *et al.*, 2011; Newsholme *et al.*, 2012). Creemos que la actividad de esta vía podría ser la responsable de la disminución de ROS que vemos en nuestros experimentos.

Por su parte, la activación de los receptores cannabinoides CB1 con el agonista selectivo ACEA disminuyó el contenido de ROS en islotes pancreáticos aislados de ratas (**Fig. 22A**) y ratones (**Fig. 24A** y **24B**) a bajas concentraciones de glucosa (3.3mM). Además, este efecto desaparece cuando se hace una pre-incubación con rimonabant (**Figs. 22B** y **24B**), sugiriendo que se trata de un efecto mediado por CB1.

Curiosamente, no hay efecto de la activación de CB1 sobre la producción de ROS en condiciones de alta glucosa (16.7mM; **Fig. 22A**). Esto podría tener relación con el hecho de que, al menos en roedores, los receptores CB1 están mayoritariamente expresados en células α (Juan-Picó *et al.*, 2006; Starowicz *et al.*, 2008; Bermúdez-Silva *et al.*, 2009), que es un tipo celular principalmente activo en condiciones de baja glucosa, mientras que en alta glucosa la menor expresión de CB1 en células β podría llevar a una menor relevancia de CB1 sobre la producción de ROS. Por tanto, los receptores CB1 de los islotes pancreáticos podrían estar implicados en los mecanismos que modulan el estrés oxidativo en este tejido. En concreto, nuestros resultados

sugieren que la señalización mediada por los receptores cannabinoides podría favorecer la reducción del daño oxidativo inducido por ROS en condiciones de hiperactivación de la célula α . Interesantemente, en la diabetes tipo 2 existe también un desajuste en la secreción de glucagón que contribuye a la hiperglucemia (Spellman, 2007; Burcelin *et al.*, 2008), y el papel de los receptores CB1 podría ser importante en la reducción del estrés oxidativo relacionado con este desajuste.

Dado que los efectos farmacológicos de ACEA y rimonabant en islotes de ratas se observaron sólo en condiciones de baja glucosa, los experimentos realizados en islotes de ratones C57BL/6J, tanto sanos como pre-diabéticos, fueron realizados solamente en esta condición de baja concentración de glucosa. Así, el bloqueo de los receptores CB1 de los islotes pancreáticos con rimonabant incrementó el contenido de ROS en islotes pancreáticos aislados de ratones sanos (**Fig. 24C**), pero no de ratas (**Fig. 22C**). De este modo, el rimonabant en islotes de ratón se comportaría como un agonista inverso del receptor CB1, produciendo una respuesta farmacológica opuesta a la del agonista (ACEA) (**Fig. 24C**). En cambio, en islotes de rata, el rimonabant no muestra un efecto *per se*. Esta diferencia entre islotes de rata y de ratón podría estar determinada por la heterogeneidad interespecífica en su acción que muestran algunos fármacos cannabinoides, lo cual podría tener relación con diferencias de expresión de CB1 y/o de otros receptores con sensibilidad a estos fármacos, como GPR55.

En cuanto a los experimentos sobre islotes de ratones pre-diabéticos, se investigó el efecto del bloqueo de CB1 con rimonabant, dadas las numerosas evidencias que hay sobre la mejora que aporta este fármaco al perfil diabético. Nuestros experimentos muestran que rimonabant no induce un incremento en ROS en islotes de ratones pre-diabéticos, como hace en islotes de ratones sanos (**Fig. 25B**). Por tanto, se observa una respuesta diferente de rimonabant entre islotes sanos e islotes pre-diabéticos.

Sería interesante estudiar también el efecto del agonista del receptor CB1, ACEA, en islotes de animales diabéticos, ya que el Δ^9 -THC (agonista de los receptores cannabinoides), parece tener un efecto protector frente al estrés oxidativo en ratas diabéticas (Coskun *et al.*, 2014).

Desconocemos los mecanismos por los cuales la activación de los receptores cannabinoides CB1 podría disminuir ROS en los islotes pancreáticos. Sin embargo, podría tener relación con la expresión de CB1 en la mitocondria, la cuál ha sido recientemente reportada y asociada a la disminución de ROS en el hipotálamo (Bénard *et al.*, 2012; Palomba *et al.*, 2015). Curiosamente, la activación de CB1 ha sido asociada a un incremento de ROS en neuronas de regiones cerebrales no relacionadas

con el control metabólico (Bénard *et al.*, 2012), y la disminución de ROS en neuronas hipotalámicas, las cuáles están implicadas en la regulación del balance energético (Palomba *et al.*, 2015). En otros tejidos de determinados modelos de enfermedad crónica, donde se relaciona a estos receptores con el estrés oxidativo, se observa que la activación del receptor CB1 incrementa dicho estrés oxidativo, así como que el rimonabant revierte estos desajustes (Tiyerili *et al.*, 2010; Mukhopadhyay *et al.*, 2010; Comelli *et al.*, 2010; Rajesh *et al.*, 2012).

En conjunto, nuestros datos sugieren que los receptores CB1 de los islotes pancreáticos participan en la modulación de los niveles de ROS, en condiciones de baja glucosa, de forma que al ser activados, disminuyen el contenido de ROS, lo que nos lleva a sugerir que éste podría ser un mecanismo relevante para disminuir el estrés oxidativo en la célula α . Además, el efecto de rimonabant sobre ROS en islotes de animales pre-diabéticos es diferente al que ejercen en islotes de animales sanos, lo que sugiere que las alteraciones en la expresión de CB1 que se producen en la obesidad y pre-diabetes podrían participar en los cambios en la homeostasis redox que se dan durante el desarrollo de esta enfermedad.

5.5 GPR55 Y SUPERVIVENCIA DE LA CÉLULA β

Existen numerosas evidencias que demuestran que los receptores cannabinoides juegan un importante papel en los fenómenos de proliferación y apoptosis, lo que ha llevado a sugerir que la modulación de estos receptores podría ser una prometedora aproximación terapéutica para combatir diversos tipos de cáncer (Nikan *et al.*, 2016). Además, CB1 ha sido implicado, entre otros tejidos, en los fenómenos de proliferación y apoptosis que tienen lugar en los islotes pancreáticos durante el desarrollo de la diabetes tipo 2 (Kim *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2012).

Asimismo, el papel de GPR55 ha sido ampliamente estudiado en el contexto del cáncer, dadas también la multitud de evidencias que apuntan a que su activación promueve la proliferación así como la participación en los fenómenos de invasividad tumoral (revisado en Henstridge *et al.*, 2011). Sin embargo, la participación de GPR55 en los fenómenos de proliferación y apoptosis que tienen lugar en el páncreas endocrino durante el desarrollo de la diabetes tipo 2 no ha sido apenas estudiada. Evidencias del grupo de la Dra. Persaud (Liu *et al.*, 2014) apuntan en este sentido, dado que los ratones carentes de GPR55 mostraron un incremento en la apoptosis de las células del islote así como una insuficiente proliferación en una situación de alta

demanda de insulina (Liu *et al.*, 2014).

En esta tesis doctoral se ha estudiado la capacidad anti-apoptótica de LH-21 y Abn-CBD en islotes pancreáticos aislados, tanto de ratones como de humanos, tras estimulación de la apoptosis con un cóctel pro-apoptótico de citoquinas. Además, estos experimentos se han realizado también en islotes de ratones C57BL/6J GPR55^{-/-} con idea de averiguar si los efectos encontrados están mediados por GPR55. Tanto LH-21 como Abn-CBD aumentaron notablemente la supervivencia en islotes de ratones WT de GPR55 (**Fig. 26A**) y en islotes humanos (**Fig. 26C**), reduciendo la apoptosis en presencia de citoquinas pro-apoptóticas. El efecto de ambos ligandos cannabinoides fue abolido en los islotes de los ratones KO de GPR55 (**Fig. 26B**), sugiriendo que ambos actúan a través de un mecanismo dependiente de GPR55 (Ruz-Maldonado *et al.*, 2015).

Estos resultados son coherentes con los obtenidos por el grupo de la Dra. Persaud, sugiriendo que la activación de GPR55 puede jugar un papel importante a la hora de contrarrestar la apoptosis inducida por la diabetes en los islotes pancreáticos. Interesantemente, este efecto protector se mantiene en islotes humanos. Por tanto, compuestos como LH-21 y Abn-CBD, así como otros que hagan diana en GPR55, podrían ser útiles para el manejo del daño celular que se produce en el islote pancreático durante la diabetes tipo 2.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

VI. CONCLUSIONES





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. Se ha desarrollado un modelo de obesidad y pre-diabetes en ratón, cuyas alteraciones en la homeostasis de la glucosa se asemejan a la de sujetos pre-diabéticos humanos, siendo por tanto, también, un modelo válido para el estudio de las alteraciones que se producen en la patogénesis de la diabetes tipo 2.
2. Los receptores CB1 modulan la actividad de las proteínas AKT, CREB y AMPK en islotes pancreáticos de ratones sanos y humanos, sugiriendo que los procesos controlados por estas vías, como la proliferación e incremento de la masa de los islotes, están modulados por CB1.
3. La modulación por CB1 de estas vías de señalización está disminuida o ausente en los islotes de animales pre-diabéticos, lo que sugiere que podrían jugar un papel en el desarrollo de diabetes tipo 2.
4. Los receptores GPR55, al igual que los CB1, modulan las vías AKT, CREB y AMPK en islotes de ratones sanos, pero sólo la vía AKT en humanos, lo que indica que hay diferencias inter-especie para GPR55. Al mismo tiempo, estos resultados sugieren que LPI, ligando endógeno de GPR55, podría utilizar la vía de señalización AKT para producir sus efectos biológicos en los islotes pancreáticos.
5. Los receptores CB1 y GPR55 modulan la movilización del Ca^{2+} intracelular y la secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS), en islotes pancreáticos de ratones sanos y de humanos. Sin embargo, los resultados obtenidos en experimentos de secreción dinámica son diferentes a los de secreción estática. Dado que los experimentos de secreción dinámica constituyen un diseño experimental más próximo a la situación *in vivo*, cabría pensar que los resultados obtenidos con esta metodología reflejan con más exactitud el papel de estos receptores en la GSIS.
6. El ligando cannabinoide LH-21, a bajas concentraciones, incrementa la movilización del Ca^{2+} intracelular y la GSIS en islotes de ratones sanos y humanos y por lo tanto tiene un efecto potenciador sobre la secreción de insulina. Dichos efectos no se observaron en islotes de ratones *knockout* para el receptor GPR55, por lo que estarían mediados por GPR55, y no por CB1 como podría inicialmente pensarse.

- 7.** El agonista del receptor GPR55, Abn-CBD, aumenta la movilización del Ca^{2+} intracelular y la GSIS en islotes pancreáticos a través de mecanismos dependientes e independientes de GPR55, mostrando que tiene un efecto potenciador sobre la secreción de insulina, pese a ser considerado en la literatura un agonista altamente selectivo de este receptor.
- 8.** Los receptores cannabinoides CB1 y la vía de señalización de mTORC1 (a través de su diana p70S6K) están funcionalmente conectados, modulando la GSIS en los islotes pancreáticos. Además, esta interacción se encuentra alterada en islotes de ratones pre-diabéticos lo que sugiere que contribuye a la fisiopatología de la diabetes tipo 2.
- 9.** Los receptores CB1 de los islotes pancreáticos participan en la modulación del contenido de ROS en los mismos, en condiciones de baja concentración de glucosa. Además, esta modulación está alterada en islotes de ratones pre-diabéticos, sugiriendo que juega un papel en la fisiopatología de la diabetes tipo 2.
- 10.** Los ligandos cannabinoides LH-21 y Abn-CBD protegen de la apoptosis a los islotes pancreáticos, tanto de ratones como de humanos, y lo hacen en un modo dependiente del receptor GPR55. Por tanto, podrían ser útiles para combatir la muerte celular que se produce en el islote pancreático durante la diabetes tipo 2.

VII. BIBLIOGRAFÍA/ REFERENCES





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

- Ahrén, B. (2000). Autonomic regulation of islet hormone secretion--implications for health and disease. *Diabetologia* 43 (4), 393-410.
- Aizawa, T., Komatsu, M., Asanuma, N., Sato, Y., Sharp, G.W. (1998). Glucose action 'beyond ionic events' in the pancreatic beta cell. *Trends Pharmacol Sci* 19 (12), 496-9.
- Aizawa, T., Kaneko, T., Yamauchi, K., Yajima, H., Nishizawa, T., Yada T., Matsukawa, H., Nagai, M., Yamada, S., Sato, Y., Komatsu, M., Itoh, N., Hidaka, H., Kajimoto, Y., Hashizume, K. (2001). Size-related and size-unrelated functional heterogeneity among pancreatic islets. *Life Sci* 69 (22), 2627-39.
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87 (2), 171.
- Alonso, M., Serrano, A., Vida, M., Crespillo, A., Hernandez-Folgado, L., Jagerovic, N., Goya, P., Reyes-Cabello, C., Perez-Valero, V., Decara, J., Macías-González, M., Bermúdez-Silva, F.J., Suárez, J., Rodríguez de Fonseca, F., Pavón, F.J. (2012). Anti-obesity efficacy of LH-21, a cannabinoid CB(1) receptor antagonist with poor brain penetration, in diet-induced obese rats. *Br J Pharmacol* 165 (7), 2274-91.
- Al-Safar, H., Hassoun, A., Almazrouei, S., Kamal, W., Afandi, B., Rais, N. (2015). Association of the Genetic Polymorphisms in Transcription Factor 7-Like 2 and Peroxisome Proliferator-Activated Receptors- γ 2 with Type 2 Diabetes Mellitus and its Interaction with Obesity Status in Emirati Population. *J Diabetes Res*, 129695-703.
- Alvarado, M., Decara, J., Luque, M.J., Hernández-Folgado, L., Gómez-Cañas, M., Gómez-Ruiz, M., Fernández-Ruiz, J., Elguero, J., Jagerovic, N., Serrano, A., Goya, P., Rodríguez de Fonseca, F. (2013). Novel antiobesity agents: synthesis and pharmacological evaluation of analogues of Rimonabant and of LH21. *Bioorg Med Chem* 21 (7), 1708-16.
- Andradas, C., Caffarel, M.M., Pérez-Gómez. E., Salazar. M., Lorente, M., Velasco, G., Guzmán, M., Sánchez, C. (2011). The orphan G protein-coupled receptor GPR55 promotes cancer cell proliferation via ERK. *Oncogene*. 30 (2):245-52.

- André, C., Cota, D. (2012). Coupling nutrient sensing to metabolic homeostasis: the role of the mammalian target of rapamycin complex 1 pathway. *Proc Nutr Soc.* 71 (4):502-10.
- Ammälä, C., Ashcroft, F.M., Rorsman, P. (1993). Calcium-independent potentiation of insulin release by cyclic AMP in single beta-cells. *Nature* 363 (6427), 356-8.
- Arrojo e Drigo, R., Ali Y, Diez, J., Srinivasan, D.K., Berggren, P.O., Boehm, B.O. (2015). New insights into the architecture of the islet of Langerhans: a focused cross-species assessment. *Diabetologia.* 58 (10):2218-28.
- Ashcroft, F.M., Harrison, D.E., Ashcroft, S.J. (1984). Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells. *Nature* 312 (5993), 446-8.
- Baker, D., Pryce, G., Davies, W.L., Hiley, C.R. (2006). *In silico* patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends Pharmacol Sci* 27 (1), 1-4.
- Balcazar, N., Sathyamurthy, A., Elghazi, L., Gould, A., Weiss, A., Shiojima, I., Walsh, K., Bernal-Mizrachi, E. (2009). mTORC1 activation regulates beta-cell mass and proliferation by modulation of cyclin D2 synthesis and stability. *J Biol Chem.* 284 (12):7832-42.
- Balenga, N.A., Aflaki, E., Kargl, J., Platzer, W., Schröder, R., Blättermann, S., Kostenis, E., Brown, A.J., Heinemann, A., Waldhoer, M. (2011). GPR55 regulates cannabinoid 2 receptor-mediated responses in human neutrophils. *Cell Res.* 21 (11):1641.
- Bhandari, R., Juluri, K.R., Resnick, A.C., Snyder, S.H. (2008). Gene deletion of inositol hexakisphosphate kinase 1 reveals inositol pyrophosphate regulation of insulin secretion, growth, and spermiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105 (7):2349-53.
- Banh, S., Wiens, L, Sotiri E, Treberg JR. (2016). Mitochondrial reactive oxygen species production by fish muscle mitochondria: Potential role in acute heat-induced oxidative stress. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 191:99-107.
- Bandyopadhyay, G.K., Yu, J.G., Ofrecio, J., Olefsky, J.M. (2005) Increased p85/55/50 expression and decreased phosphatidylinositol 3-kinase activity in insulin-resistant human skeletal muscle. *Diabetes.* 54(8):2351-9.

- Bandyopadhyay, G.K., Yu, J.G., Ofrecio, J., Olefsky, J.M. (2006). Increased malonyl-CoA levels in muscle from obese and type 2 diabetic subjects lead to decreased fatty acid oxidation and increased lipogenesis; thiazolidinedione treatment reverses these defects. *Diabetes*. 55 (8):2277-85.
- Bartolomé, A., Guillen, C., Benito, M. (2010). Role of the TSC1-TSC2 complex in the integration of insulin and glucose signalling involved in pancreatic beta-cell proliferation. *Endocrinology* 151, 3084-3094.
- Bartolomé, A., Kimura-Koyanagi, M., Asahara, S., Guillén, C., Inoue, H., Teruyama, K., Shimizu, S., Kanno, A., García-Aguilar, A., Koike, M., Uchiyama, Y., Benito, M., Noda, T., Kido, Y. (2014). Pancreatic β -cell failure mediated by mTORC1 hyperactivity and autophagic impairment. *Diabetes*. 63(9):2996-3008.
- Bell, E., Cao, X., Moibi, J.A., Greene, S.R., Young, R., Trucco, M., Gao, Z., Matschinsky, F.M., Deng, S., Markman, J.F., Naji, A., Wolf, B.A. (2003). Rapamycin has a deleterious effect on MIN-6 cells and rat and human islets. *Diabetes* 52, 2731-273.
- Bellocchio, L., Mancini, G., Vicennati, V., Pasquali, R., Pagotto, U. (2006). Cannabinoid receptors as therapeutic targets for obesity and metabolic diseases. *Curr Opin Pharmacol* 6, 586-91.
- Bensaïd, M., Gary-Bobo, M., Esclangon, A., Maffrand, J.P., Le Fur, G., Oury-Donat, F., Soubrié, P. (2003). The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 increases Acrp30 mRNA expression in adipose tissue of obese fa/fa rats and in cultured adipocyte cells. *Mol Pharmacol*. 63 (4):908-14.
- Bénard, G., Massa, F., Puente, N., Lourenço, J., Bellocchio, L., Soria-Gómez, E., Matias, I., Delamarre, A., Metna-Laurent, M., Cannich, A., Hebert-Chatelain, E., Mülle, C., Ortega-Gutiérrez, S., Martín-Fontecha, M., Klugmann, M., Guggenhuber, S., Lutz, B., Gertsch, J., Chaoulhoff, F., López-Rodríguez, M.L., Grandes, P., Rossignol, R., Marsicano, G. (2012). Mitochondrial CB₁ receptors regulate neuronal energy metabolism. *Nat Neurosci*. 15(4):558-64.
- Bernard, C., Thibault, C., Berthault, M.F., Magnan, C., *et al.* (1998). Pancreatic beta-cell regeneration alter 48-h glucose infusión in mildly diabetic rats is not carrelated with functional improvement. *Diabetes* 47, 1058-1065.

- Bermúdez-Silva, F.J., Suárez, J., Baixeras, E., Cobo, N., Bautista, D., Cuesta-Muñoz, A.L., *et al.* (2008). Presence of functional cannabinoid receptors in human endocrine pancreas. *Diabetologia* 51, 476-87.
- Bermúdez-Silva, F.J., Suárez Pérez. J., Nadal, A., Rodríguez de Fonseca, F. (2009) The role of the pancreatic endocannabinoid system in glucose metabolism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 23 (1):87-102.
- Bermúdez-Silva, F.J., Viveros, M.P., McPartland, J.M., Rodriguez de Fonseca, F. (2010). The endocannabinoid system, eating behavior and energy homeostasis: the end or a new beginning? *Pharmacol Biochem Behav.* 95(4):375-82.
- Bermúdez-Silva, F.J., Romero-Zerbo, S.Y., Haissaguerre, M., Ruz-Maldonado, I., Lhamyani, S., El Bekay, R., Tabarin, A., Marsicano, G., Cota, D. (2016). The cannabinoid CB1 receptor and mTORC1 signalling pathways interact to modulate glucose homeostasis in mice. *Dis Model Mech.* 9 (1):51-61.
- Berry, E.M., Mechoulam, R. (2002). Tetrahydrocannabinol and endocannabinoids in feeding and appetite. *Pharmacol Ther.* 95 (2):185-90.
- Biden, T.J., Boslem, E., Chu, K.Y., Sue, N. (2014). Lipotoxic endoplasmic reticulum stress, β cell failure, and type 2 diabetes mellitus. *Trends Endocrinol Metab.* 25 (8):389-98.
- Bifulco, M., Grimaldi, C., Gazzero, P., Písanti, S., Santoro, A. (2007). Rimonabant: Just an Antiobesity drug? Current evidence on its pleiotropic effects. *Mol Pharmacol* 71, 1445-56.
- Bindokas, V.P., Kuznetsov, A., Sreenan, S., Polonsky, K.S., Roe, M.W., Philipson, L.H. (2003). Visualizing superoxide production in normal and diabetic rat islets of Langerhans. *J Biol Chem.* 278 (11):9796-801.
- Bisogno, T., Berrendero, F., Ambrosino, G., Cebeira, M., Ramos, J.A., Fernandez-Ruíz, J.J., *et al.* (1999). Brain regional distribution of endocannabinoids: Implications for their biosynthesis and biological function. *Biochem Biophys Res Commun* 256, 377-80.
- Bisogno, T., Howell, F., Williams, G., Minassi, A., Cascio, M.G., Ligresti, A., Matias, I., Schiano-Moriello, A., Paul, P., Williams, E.J., Gangadharan, U., Hobbs, C., Di Marzo, V., Doherty, P. (2003). Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J Cell Biol* 163 (3), 463-8.

- Bjelakovic, G., Nikolova, D., Gluud, L.L., Simonetti, R.G., Gluud, C. (2007). Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 297(8):842-57.
- Blandino-Rosano, M., Chen, A.Y., Scheys, J.O., Alejandro, E.U., Gould, A.P., Taranukha, T., Elghazi, L., Cras-Méneur, C., Bernal-Mizrachi, E. (2012). mTORC1 signaling and regulation of pancreatic β -cell mass. *Cell Cycle*. 11(10):1892-902.
- Blázquez, C., Chiarlone, A., Bellocchio, L., Resel, E., Pruunsild, P., García-Rincón, D., Sendtner, M., Timmusk, T., Lutz, B., Galve-Roperh, I., Guzmán, M. (2015). The CB1 cannabinoid receptor signals striatal neuroprotection via a PI3K/Akt/mTORC1/BDNF pathway. *Cell Death Differ* 22 (10), 1618-29.
- Bonner-Weir, S., Deery, D., Leahy, J.L., Weir, G.C. (1989). Compensatory growth of pancreatic beta-cells in adult rats after a short-term glucose infusion. *Diabetes* 38, 49-53.
- Bonner-Weir, S. (1994). Regulation of pancreatic beta-cell mass *in vivo*. *Recent Prog Horm Res* 49, 91-104.
- Bonner-Weir, S., Inada, A., Yatoh, S., Li, W.C., Aye, T., Toschi, E., Sharma, A. (2008). Transdifferentiation of pancreatic ductal cells to endocrine beta-cells. *Biochem Soc Trans* 36 (3), 353-6.
- Bouwens, L., Rooman, I. (2005). Regulation of pancreatic beta-cell mass. *Physiol Rev*. 85(4):1255-70.
- Boveris, A., Oshino, N., Chance, B. (1972). The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochemical Journal* 128, 617-630.
- Bowe, J.E., Franklin, Z.J., Hauge-Evans, A.C., King, A.J., Persaud, S.J., Jones, P.M. (2014). Metabolic phenotyping guidelines: assessing glucose homeostasis in rodent models. *J Endocrinol* 222 (3), G13-25.
- Brissova, M., Fowler, M.J., Nicholson, W.E., Chu, A., Hirshberg, B., Harlan, D.M., Powers, A.C. (2005). Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *J Histochem Cytochem* 53 (9), 1087-97.

- Bosco, D., Armanet, M., Morel, P., Niclauss, N., Sgroi, A., Muller, Y.D., Giovannoni, L., Parnaud, G., Berney, T. (2010). Unique arrangement of alpha- and beta-cells in human islets of Langerhans. *Diabetes* 59 (5), 1202-10.
- Brereton, M.F., Vergari, E., Zhang, Q., Clark, A. (2015). Alpha-, Delta- and PP-cells: Are They the Architectural Cornerstones of Islet Structure and Coordination? *J Histochem Cytochem* 63 (8), 575-91
- Boucher, M.J., Selander, L., Carlsson, L., Edlund, H. (2006). Phosphorylation marks IPF1/PDX1 protein for degradation by glycogen synthase kinase 3-dependent mechanisms. *J Biol Chem.* 281 (10):6395-403.
- Bouzakri, K., Karlsson, H.K., Vestergaard, H., Madsbad, S., Christiansen, E., Zierath, J.R. (2006) IRS-1 serine phosphorylation and insulin resistance in skeletal muscle from pancreas transplant recipients. *Diabetes* 55 (3), 785-91.
- Brownlee, M. (2005). The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 54, 1615-1625.
- Brubaker, P.L., Drucker, D.J. (2004). Minireview: Glucagon-like peptides regulate cell proliferation and apoptosis in the pancreas, gut, and central nervous system. *Endocrinology.* 145 (6):2653-9.
- Burcelin, R., Knauf, C., Cani, P.D. (2008). Pancreatic alpha-cell dysfunction in diabetes. *Diabetes Metab* 34(2), S49-55.
- Butler, A.E., Janso, J., Bonner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R.A., Butler, P.C. (2003). Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52 (1), 102-10.
- Cabrera, O., Berman, D.M., Kenyon, N.S., Ricordi, C., Berggren, P.O., Caicedo, A. (2006). The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci USA* 103 (7), 2334-9.
- Campos, A.C., Guimarães, F.S. (2008). Involvement of 5HT1A receptors in the anxiolytic-like effects of cannabidiol injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2, 223-30.
- Carling D. (2004). AMPK. *Curr Biol.* 14 (6):R220.

- Casu, M.A., Pisu, C., Sanna, A., Tambaro, S., Spada, G.P., Mongeau, R., Pani, L. (2005). Effect of delta9-tetrahydrocannabinol on phosphorylated CREB in rat cerebellum: an immunohistochemical study. *Brain Res* 1048 (1-2), 41-7.
- Cavuoto, P., McAinch, A.J., Hatzinikolas, G., Janovská, A., Game, P., Wittert, G.A. (2007). The expression of receptors for endocannabinoids in human and rodent skeletal muscle. *Biochem. Biophys Res. Commun* 364, 105-110.
- Chandra, J., Samali, A., Orrenius, S. (2000). Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radical Biology Medicine* 29, 323-333.
- Charollais, A., Gjinovci, A., Huarte, J., Bauquis, J., Nadal, A., Martín, F., Andreu, E., Sánchez-Andrés, J.V., Calabrese, A., Bosco, D., Soria, B., Wollheim, C.B., Herrera, P.L., Meda, P. (2000). Junctional communication of pancreatic beta cells contributes to the control of insulin secretion and glucose tolerance. *J Clin Invest* 106 (2), 235-43.
- Chakraborty, A., Koldobskiy, M.A., Bello, N.T., Maxwell, M., Potter, J.J., Juluri, K.R., Maag, D., Kim, S., Huang, A.S., Dailey, M.J., Saleh, M., Snowman, A.M., Moran, T.H., Mezey, E., Snyder, S.H. (2010). Inositol pyrophosphates inhibit Akt signaling, thereby regulating insulin sensitivity and weight gain. *Cell*. 143(6):897-910.
- Charles, M.A., Lawecki, J., Pictet, R., Grodsky, G.M. (1975). Insulin secretion. Interrelationships of glucose, cyclic adenosine 3:5-monophosphate, and calcium. *J Biol Chem* 250 (15), 6134-40.
- Chen, F., Guo, Z., Wu, M., Zhou, Z., Luo, W. (2003). [Impact of dynamic changes of waist circumference and body mass index on type 2 diabetes mellitus risk]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*. 49(12):1092-7.
- Chen, Q.K., Chen, H.Y., Wang, L.Y., Zeng, Z.Y., Zhou, X.D. (2004). Associated risk factors of fatty liver in the patients with type 2 diabetes mellitus. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*. 12(7):414-6.
- Chen, R.Z., Frassetto, A., Lao, J.Z., Huang, R.R., Xiao, J.C., Clements, M.J., Walsh, T.F., Hale, J.J., Wang, J., Tong, X., Fong, T.M. (2008). Pharmacological evaluation of LH-21, a newly discovered molecule that binds to cannabinoid CB1 receptor. *Eur J Pharmacol*. 584 (2-3):338-42.
- Childers S.R., Deadwyler S.A. (1996). Role of cyclic AMP in the actions of cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 52 (6), 819-27.

- Colombo, G., Agabio, R., Diaz, G., Lobina, C., Reali, R., Gessa, G.L. (1998). Appetite suppression and weight loss after the cannabinoid antagonist SR 141716. *Life Sci.* 63(8):PL113-7.
- Comelli, F., Bettoni, I., Colombo, A., Fumagalli, P., Giagnoni, G., Costa, B. (2010). Rimonabant, a cannabinoid CB1 receptor antagonist, attenuates mechanical allodynia and counteracts oxidative stress and nerve growth factor deficit in diabetic mice. *Eur J Pharmacol* 637 (1-3), 62-9.
- Console-Bram, L., Brailoiu, E., Brailoiu, G.C., Sharir, H., Abood, M.E. (2014). Activation of GPR18 by cannabinoid compounds: a tale of biased agonism. *Br J Pharmacol* 171, 3908-17.
- Cook, D.L., Satin, L.S., Ashford, M.L., Hales, C.N. (1988). ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic beta-cells. Spare-channel hypothesis. *Diabetes* 37 (5), 495-8.
- Coskun, Z.M., Bolkent, S. (2014). Oxidative stress and cannabinoid receptor expression in type-2 diabetic rat pancreas following treatment with Δ^9 -THC. *Cell Biochem Funct* 32 (7), 612-9.
- Costes, S., Vandewalle, B., Tourrel-Cuzin, C., Broca, C., Linck, N., Bertrand, G., Kerr-Conte, J., Portha, B., Pattou, F., Bockaert, J., Dalle, S. (2009). Degradation of cAMP-responsive element-binding protein by the ubiquitin-proteasome pathway contributes to glucotoxicity in beta-cells and human pancreatic islets. *Diabetes*. 58(5):1105-15.
- Cota, D., Marsicano, G., Tschop, M., *et al.* (2003). The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest* 112, 423-431.
- Cota, D. (2007). CB1 receptors: emerging evidence for central and peripheral mechanisms that regulate energy balance, metabolism and cardiovascular health. *Diabetes Metab Res Rev* 23, 507-17.
- Cota, D., Matter, E.K., Woods, S.C., Seeley, R.J. (2008). The role of hypothalamic mammalian target of rapamycin complex 1 signaling in diet-induced obesity. *J Neurosci.* 28 (28):7202-8.
- Cota, D. (2009). Mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling in energy balance and obesity. *Physiol Behav.* 97 (5):520-4.

- Costa, B., Piñol, J.L., Martín, F., Donado, A., Castell, C. (2002). [Significant incidence of type 2 diabetes on high-risk Spanish population. The IGT Study (2)]. *Med Clin (Barc)*. 118(8):287-93.
- Coughlan, K.A., Valentine, R.J., Ruderman, N.B., Saha, A.K. (2014). AMPK activation: a therapeutic target for type 2 diabetes? *Diabetes Metab Syndr Obes* 24 (7), 241-53.
- Cravatt, B.F., Giang, D.K., Mayfield, S.P., Boger, D.L., Lerner, R.A., Gilula, N.B. (1996). Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*, 384 (6604), 83-7.
- Christie, M.R., Ashcroft, S.J. (1984). Cyclic AMP-dependent protein phosphorylation and insulin secretion in intact islets of Langerhans. *Biochem J* 218 (1), 87-99.
- Dachicourt, N., Serradas, P., Giroix, M.H., Gangnerau, M.N., Portha, B. (1996). Decreased glucose-induced cAMP and insulin release in islets of diabetic rats: reversal by IBMX, glucagon, GIP. *Am J Physiol* 271 (1), E725-32.
- Dai, N., Rapley, J., Angel, M., Yanik, M.F., Blower, M.D., Avruch, J. (2011). mTOR phosphorylates IMP2 to promote IGF2 mRNA transation by internal ribosomal entry. *Genes Dev* 25, 1159-1172.
- Dagon, Y., Hur, E., Zheng, B., Wellenstein, K., Cantley, L.C., Kahn, B.B. (2012). p70S6 kinase phosphorylates AMPK on serine 491 to mediate leptin's effect on food intake. *Cell Metab.* 16 (1):104-12.
- Dalle, S., Quoyer, J., Varin, E., Costes, S. (2011) Roles and regulation of the transcription factor CREB in pancreatic β -cells. *Curr Mol Pharmacol.* 4 (3):187-95.
- Dando, I., Donadelli, M., Costanzo, C., Dalla Pozza, E., D'Alessandro, A., Zolla, L., Palmieri, M. (2013). Cannabinoids inhibit energetic metabolism and induce AMPK-dependent autophagy in pancreatic cancer cells. *Cell Death Dis* 13, 4: e664.
- DeBosch, B., Sambandam, N., Weinheimer, C., Courtois, M., Muslin, A.J. (2006). Akt2 regulates cardiac metabolism and cardiomyocyte survival. *J Biol Chem.* 281(43):32841-51.

- Del Guerra, S., Lupi, R., Marselli, L., Masini, M., Bugliani, M., Sbrana, S., Torri, S., Pollera, M., Boggi, U., Mosca, F., Del Prato, S., Marchetti, P. (2005). Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes. *Diabetes*. 54 (3):727-35.
- Deng, S., Vatamaniuk, M., Huang, X., Doliba, N., Lian, M.M., Frank, A., Velidedeoglu, E., Desai, N.M., Koeberlein, B., Wolf, B., Barker, C.F., Naji, A., Matschinsky, F.M., Markmann, J.F. (2004). Structural and functional abnormalities in the islets isolated from type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 53 (3), 624-32.
- Devane, W.A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., Griffin, G., *et al.* (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258, 1946-9.
- De Petrocellis, L., Di Marzo, V. (2009). An introduction to the endocannabinoid system: from the early to the latest concepts. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 23, 1-15.
- De Petrocellis, L., Marini, P., Matias, I., Moriello, A.S., Starowicz, K., Cristino, L., *et al.* (2007). Mechanisms for the coupling of cannabinoid receptors to intracellular calcium mobilization in rat insulinoma beta-cells. *Exp Cell Res* 313, 2993-3004.
- De Petrocellis, L., Vellani, V., Schiano-Moriello, A., Marini, P., Magherini P.C., Orlando, P., Di Marzo, V. (2008). Plant-derived cannabinoids modulate the activity of transient receptor potential channels of ankyrin type-1 and melastatin type-8. *J Pharmacol Exp Ther* 325 (3), 1007-15.
- Demuth, D.G., Molleman, A. (2006). Cannabinoid signalling. *Life Sciences* 78, 549-63.
- Després, J.P., Golay, A., Sjöström, L. (2005). Effects of rimonabant on metabolic risk factors in overweight patients with dyslipidemia. *N Engl J Med*. 353 (20):2121-34.
- Després, J.P., Ross, R., Boka, G., Alméras, N., Lemieux, I.; ADAGIO-Lipids Investigators.. (2009). Effect of rimonabant on the high-triglyceride/ low-HDL-cholesterol dyslipidemia, intraabdominal adiposity, and liver fat: the ADAGIO-Lipids trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 29 (3):416-23.

- Díaz-Arteaga A., Vázquez, M.J., Vazquez-Martínez, R., Pulido, M.R., Suarez, J., Velásquez, D.A., López, M., Ross, R.A., de Fonseca, F.R., Bermudez-Silva, F.J., Malagón, M.M., Diéguez, C., Nogueiras, R. (2012). The atypical cannabinoid O-1602 stimulates food intake and adiposity in rats. *Diabetes Obes Metab* 14 (3), 234-43.
- Di Marzo, V. (2008). The endocannabinoid system in obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia* 51: 1356-1367.
- Di Marzo, V., Capasso, R., Matias, I., Aviello, G., Petrosino, S., Borrelli, F., Romano, B., Orlando, P., Capasso, F., Izzo, A.A. (2008). The role of endocannabinoids in the regulation of gastric emptying: alterations in mice fed a high-fat diet. *Br J Pharmacol.* 153 (6):1272-80.
- Di Marzo, V. (2009). The endocannabinoid system: Its general strategy of action: tools for its pharmacological manipulation and potential therapeutic exploitation. *Pharmacol Res* 60, 77-84.
- Di Marzo, V., Despres, J.P. (2009). CB1 antagonist for obesity what lessons have we learned from rimonabant? *Nat Rev Endocrinol* 5, 633-8.
- Di Marzo, V., Ligresti, A., Cristino, L. (2009). The endocannabinoid system as a link between homeostatic and hedonic pathways involved in energy balance regulation. *Int Obes* 33, 18-24.
- Dickson, L.M., Rhodes, C.J. (2004). Pancreatic beta-cell growth and survival in the onset of type 2 diabetes: a role for protein kinase B in the Akt? *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 287(2):E192-8.
- Dolenšek, J., Rupnik, M.S., Stožer, A. (2015). Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas. *Islets* 7 (1), e1024405.
- Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control cell function. *Physiological Reviews* 82, 47-95.
- Drucker, D.J. (2003). Glucagon-like peptide-1 and the islet beta-cell: augmentation of cell proliferation and inhibition of apoptosis. *Endocrinology.* 144(12):5145-8.
- Du, K., Montminy, M. (1998). CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *J Biol Chem.* 273(49):32377-9.

- Dunne, M.J., Petersen, O.H. (1986). Intracellular ADP activates K⁺ channels that are inhibited by ATP in an insulin-secreting cell line. *FEBS Lett* 208 (1), 59-62.
- Duvivier, V.F., Delafoy-Plasse, L., Delion, V., Lechevalier, P., Le Bail, J.C., Guillot, E., Pruniaux, M.P., Galzin, A.M. (2009). Beneficial effect of a chronic treatment with rimonabant on pancreatic function and beta-cell morphology in Zucker Fatty rats. *Eur J Pharmacol* 616 (1-3), 314-20.
- Elayat, A.A., el-Naggar, M.M., Tahir, M. (1995). An immunocytochemical and morphometric study of the rat pancreatic islets. *J Anat* 186 (3), 629-37.
- Elghazi, L., Rachdi, L., Weiss, A.J., Cras-Méneur, C., Bernal-Mizrachi, E. (2007). Regulation of beta-cell mass and function by the Akt/protein kinase B signalling pathway. *Diabetes Obes Metab.* 9 (2):147-57.
- Elghazi, L., Balcázar, N., Blandino-Rosano, M., Cras-Meneur, C., Fatrai, S., *et al.* (2010). Decreased IRS signalling impairs beta-cell cycle progression and survival in transgenic mice overexpressing S6K in beta-cells. *Diabetes* 59, 2390-2399.
- Erlandsen, S.L., Hegre, O.D., Parsons, J.A., McEvoy, R.C., Elde, R.P. (1976). Pancreatic islet cell hormones distribution of cell types in the islet and evidence for the presence of somatostatin and gastrin within the D cell. *J Histochem Cytochem* 7, 883-97.
- Evans, J.L., Goldfine, I.D., Maddux, B.A., Grodsky, M.S. (2002). Oxidative stress and stress activated signalling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 23, 599-622.
- Fabian, M.C., Lakey, J.R., Rajotte, R.V., Kneteman, N.M. (1993). The efficacy and toxicity of rapamycin in murine islet transplantation. *In vitro* and *in vivo* studies. *Transplantation* 56, 1137-1142.
- Ferdaoussi, M., Bergeron, V., Zarrouki, B., Kolic, J., Cantley, J., Fielitz, J., Olson, E.N., Prentki, M., Biden, T., MacDonald, P.E., Poitout, V. (2012). G protein-coupled receptor (GPR)40-dependent potentiation of insulin secretion in mouse islets is mediated by protein kinase D1. *Diabetologia* 55 (10), 2682-92.
- Finegood, D.T., Scaglia, L., Bonner-Weir, S. (1995). Dynamics of beta-cell mass in the growing rat pancreas. Estimation with a simple mathematical model. *Diabetes* 44 (3), 249-56.

- Fonseca, B.M., Correia-da-Silva, G., Teixeira, N.A. (2013). The endocannabinoid anandamide induces apoptosis of rat decidual cells through a mechanism involving ceramide synthesis and p38 MAPK activation. *Apoptosis* 18 (12), 1526-35.
- Forouhi, N.G., Wareham, N.J. (2014). Epidemiology of diabetes. *Medicine (Abingdon)* 42 (12), 698-702.
- Fritsche, L., Weigert, C., Häring, H.U., Lehmann, R. (2008). How insulin receptor substrate proteins regulate the metabolic capacity of the liver--implications for health and disease. *Curr Med Chem* 15 (13), 1316-29.
- Garami, A., Zwartkruis, F.J., Nobukuni, T., Joaquin, M., Rocco, M., *et al.* (2003). Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 and TSC2. *Mol Cell* 11, 1457-1466.
- Garofalo, R.S., Orena, S.J., Rafidi, K., Torchia, A.J., Stock, J.L., Hildebrandt, A.L., Coskran, T., Black, S.C., Brees, D.J., Wicks, J.R., McNeish, J.D., Coleman, K.G. (2003). Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta. *J Clin Invest.* 112 (2):197-208.
- Gefel, D., Hendrick, G.K., Mojsov, S., Habener, J., Weir, G.C. (1990). Glucagon-like peptide-I analogs: effects on insulin secretion and adenosine 3',5'-monophosphate formation. *Endocrinology* 126 (4), 2164-8.
- Gehrman, W., Elsner, M., Lenzen, S. (2010). Role of metabolically generated reactive oxygen species for lipotoxicity in pancreatic beta-cells. *Diabetes, Obesity Metabolism* 12, 149-158.
- Gembal M., Gilon P., Henquin J.C. (1992). Evidence that glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive K⁺ channels in mouse beta cells. *J Clin Invest* 89 (4), 1288-95.
- George, S., Rochford, J.J., Wolfrum, C., Gray, S.L., Schinner, S., Wilson, J.C., Soos, M.A., Murgatroyd, P.R., Williams, R.M., Acerini, C.L., Dunger, D.B., Barford, D., Umpleby, A.M., Wareham, N.J., Davies, H.A., Schafer, A.J., Stoffel, M., O'Rahilly, S., Barroso, I. (2004). A family with severe insulin resistance and diabetes due to a mutation in AKT2. *Science.* 304 (5675):1325-8.

- Gatta-Cherifi, B., Cota, D. (2015). New insights on the role of the endocannabinoid system in the regulation of energy balance. *Int J Obes*, 40(2):210-9
- Getty-Kaushik, L., Richard, A.M., Deeney, J.T., Krawczyk, S., Shirihai, O., Corkey, B.E. (2009). The CB1 antagonist rimonabant decreases insulin hypersecretion in rat pancreatic islets. *Obesity (Silver Spring)* 17 (10), 1856-60.
- Gleason, C.E., Lu, D., Witters, L.A., Newgard, C.B., Birnbaum, M.J. (2007). The role of AMPK and mTOR in nutrient sensing in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 282, 10341-10351.
- Gilon, P., Chae, H.Y., Rutter, G.A., Ravier, M.A. (2014). Calcium signaling in pancreatic β -cells in health and in Type 2 diabetes. *Cell Calcium* 56 (5), 340-61.
- Giorgino, F., Laviola, L., Leonardini, A. (2005). Pathophysiology of type 2 diabetes: rationale for different oral antidiabetic treatment strategies. *Diabetes Res Clin Pract* 68 (1), 22-9.
- Godlewski, G., Offertáler, L., Wagner, J.A., Kunos, G. (2009). Receptors for acylethanolamides-GPR55 and GPR119. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 89(3-4):105-11.
- Gomez, E., Powel, M.L., Bevington A., Herbert, TP. (2004). A decreased in cellular energy status stimulates PERK-dependent eIF2alpha phosphorylation and regulates protein synthesis in pancreatic beta-cells. *Biochem J* 410, 485-493.
- Gómez del Pulgar, T., Velasco, G., Guzmán, M. (2000). The CB1 cannabinoid receptor is coupled to the activation of protein kinase B/Akt. *Biochem J* 347 (2), 369-73.
- Gomis, A., Sánchez-Andrés, J.V., Valdeolmillos, M. (1996). Oscillatory patterns of electrical activity in mouse pancreatic islets of Langerhans recorded *in vivo*. *Pflugers Arch* 432 (3), 510-5.
- González-Mariscal, I., Krzysik-Walker, S.M., Doyle, M.E., Liu, Q.R., Cimbrow, R., Santa-Cruz Calvo, S., Ghosh, S., Cieśła, Ł., Moaddel, R., Carlson, O.D., Witek, R.P., O'Connell, J.F, Egan, J.M. (2016). Human CB1 Receptor Isoforms, present in Hepatocytes and β -cells, are Involved in Regulating Metabolism. *Sci. Rep.* 6, 33302.

- Gonzalez GA, Montminy MR. (1989). Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell*. 59(4):675-80.
- Göpel, S.O., Kanno, T., Barg, S., Rorsman, P. (2000). Patch-clamp characterisation of somatostatin-secreting -cells in intact mouse pancreatic islets. *J Physiol* 528 (3), 497-507.
- Greenman, I.C, Gomez, E., Moore, C.E, Herbert, T.P. (2007). Distinct glucose dependent stress responses revealed by translational profiling in pancreatic beta-cells. *J Endocrinol* 192, 179-187.
- Grill, V., Cerasi, E. (1973). Activation by glucose of adenylyl cyclase in pancreatic islets of the rat. *FEBS Lett* 33 (3), 311-4.
- Grodsky, G.M. (1970). Insulin and the pancreas. *Vitam Horm* 28, 37-101.
- Grube, D., Bohn, R. (1983). The microanatomy of human islets of Langerhans, with special reference to somatostatin (D-) cells. *Arch Histol Jpn* 46 (3), 327-53.
- Gruden, G., Barutta, F., Kunos, G., Pacher, P. (2015). Role of the endocannabinoid system in diabetes and diabetic complications. *Br J Pharmacol*.
- Haissaguerre, M., Saucisse, N., Cota, D. (2014). Influence of mTOR in energy and metabolic homeostasis. *Mol Cell Endocrinol*. 397 (1-2):67-77.
- Hardie, D.G., Sakamoto, K. (2006). AMPK: a key sensor of fuel and energy status in skeletal muscle. *Physiology (Bethesda)*. 21:48-60.
- Hammar, E., Tomas, A., Bosco, D., Halban, P.A. (2009). Role of the Rho-ROCK (Rho-associated kinase) signaling pathway in the regulation of pancreatic beta-cell function. *Endocrinology*. 150 (5):2072-9.
- Hay, N. (2011). Akt isoforms and glucose homeostasis - the leptin connection. *Trends Endocrinol Metab*. 22 (2):66-73.
- Heart, E., Corkey, R.F., Wikstrom, J.D., Shirihai, O.S., Corkey, B.E. (2006). Glucose-dependent increase in mitochondrial membrane potential, but not cytoplasmic calcium, correlates with insulin secretion in single islet cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290 (1), E143-E148.

- Hemmings, B.A., Restuccia, D.F. (2012). PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4 (9):a011189.
- Hennige, A.M., Burks, D.J., Ozcan, U., Kulkarni, R.N., Ye, J., Park, S., Schubert, M., Fisher, T.L., Dow, M.A., Leshan, R., Zakaria, M., Mossa-Basha, M., White, M.F. (2003). Upregulation of insulin receptor substrate-2 in pancreatic beta cells prevents diabetes. *J Clin Invest.* 112(10):1521-32.
- Henquin, J.C., Nenquin, M., Stienet, P., Ahren, B. (2006). *In vivo* and *in vitro* glucose-induced biphasic insulin secretion in the mouse: pattern and role of cytoplasmic Ca²⁺ and amplification signals in beta-cells. *Diabetes* 55 (2), 441-51.
- Henstridge, C.M., Balenga, N.A., Ford, L.A., Ross, R.A., Waldhoer, M., Irving, A.J. (2009). The GPR55 ligand L-alpha-lysophosphatidylinositol promotes RhoA-dependent Ca²⁺ signaling and NFAT activation. *FASEB J* 23 (1), 183-93.
- Henstridge, C.M., Balenga, N.A., Schröder, R., Kargl, J.K., Platzer, W., Martini, L., Arthur, S., Penman, J., Whistler, J.L., Kostenis, E., Waldhoer, M., Irving, A.J. (2010). GPR55 ligands promote receptor coupling to multiple signalling pathways. *Br J Pharmacol* 160 (3), 604-14.
- Henstridge, C.M., Balenga, N.A., Kargl, J., Andradas, C., Brown, A.J., Irving, A., Sanchez, C., Waldhoer, M. (2011). Minireview: recent developments in the physiology and pathology of the lysophosphatidylinositol-sensitive receptor GPR55. *Mol Endocrinol* 25 (11), 1835-48.
- Hers, I., Vincent, E.E., Tavaré, J.M. (2011). Akt signalling in health and disease. *Cell Signal.* 23 (10):1515-27.
- Hillard *et al* (1999). Synthesis and characterization of potent and selective agonists of the neuronal cannabinoid receptor (CB1). *J Pharmacol ExpTher* 289, 1427.
- Hoang, D.T., Matsunari, H., Nagaya, M., Nagashima, H., Millis, J.M., Witkowski, P., Periwal, V., Hara, M., Jo, J. (2014). A conserved rule for pancreatic islet organization. *PLoS One* 9 (10), e110384.
- Ho, WS. (2010). Angiogenesis: a new physiological role for N-arachidonoyl serine and GPR55? *Br J Pharmacol* 160 (7), 1580-2.

- Horman, S., Vertommen, D., Heath, R., Neumann, D., Mouton, V., Woods, A., Schlattner, U., Wallimann, T., Carling, D., Hue, L., Rider, M.H. (2006). Insulin antagonizes ischemia-induced Thr172 phosphorylation of AMP-activated protein kinase alpha-subunits in heart via hierarchical phosphorylation of Ser485/491. *J Biol Chem.* 281(9):5335-40.
- Howell, J.J., Manning, B.D. (2011). mTOR couples cellular nutrient sensing to organismal metabolic homeostasis. *Trends Endocrinol Metab* 22, 94-102.
- Howlett, A.C., Barth, F., Bonner, T.I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W.A., et al. (2002). International union of pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* 54, 161-202.
- Howlett, A.C., Championdorow, T.M., McMahon, L.L., Westlake, T.M. (1990). The Cannabinoid Receptor-Biochemical and Cellular Properties in Neuroblastoma-Cells. International Conference Cannabis and the Cannabinoids. Crete, Greece: *Pergamon-Elsevier Science Ltd*, 565-9.
- Huang, G.C., Zhao, M., Jones, P., Persaud, S., Ramracheya, R., Löbner, K., Christie, M.R., Banga, J.P., Peakman, M., Sirinivsan, P., Rela, M., Heaton, N., Amiel, S. (2004). The development of new density gradient media for purifying human islets and islet-quality assessments. *Transplantation* 77 (1), 143-5.
- Hui, H., Nourparvar, A., Zhao, X., Perfetti, R. (2003). Glucagon-like peptide-1 inhibits apoptosis of insulin-secreting cells via a cyclic 5'-adenosine monophosphate-dependent protein kinase A- and a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *Endocrinology.* 144(4):1444-55.
- Hull, R.L., Kodama, K., Utzschneider, K.M., Carr, D.B., Prigeon, R.L., Kahn, S.E. (2005). Dietary-fat-induced obesity in mice results in beta cell hyperplasia but not increased insulin release: evidence for specificity of impaired beta cell adaptation. *Diabetologia* 48 (7), 1350-8.
- Hussain, S.A. (2007). Silymarin as an adjunct to glibenclamide therapy improves long-term and postprandial glycemic control and body mass index in type 2 diabetes. *J Med Food* 10(3):543-7.

- Imbernon, M., Whyte, L., Diaz-Arteaga, A., Russell, W.R., Moreno, N.R., Vazquez, M.J., Gonzalez, C.R., Díaz-Ruiz, A., Lopez, M., Malagón, M.M., Ross, R.A., Dieguez, C., Nogueiras, R. (2014). Regulation of GPR55 in rat white adipose tissue and serum LPI by nutritional status, gestation, gender and pituitary factors. *Mol Cell Endocrinol.* 383 (1-2):159-69.
- Illies, C., Gromada, J., Fiume, R., Leibiger, B., Yu, J., Juhl, K., Yang, S.N., Barma, D.K., Falck, J.R., Saiardi, A., Barker, C.J., Berggren, P.O. (2007). Requirement of inositol pyrophosphates for full exocytotic capacity in pancreatic beta cells. *Science.* 318 (5854):1299-302.
- Imoto, H., Sasaki, N., Iwase, M., Nakamura, U., Oku, M., Sonoki, K., Uchizono, Y., Iida, M. (2008). Impaired insulin secretion by diphenyleneiodium associated with perturbation of cytosolic Ca²⁺ dynamics in pancreatic beta-cells. *Endocrinology.* 149 (11):5391-400.
- Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J., Guan, K.L. (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol.* 4 (9):648-57.
- Ishiguro, H., Onaivi, E.S., Horiuchi, Y., Imai, K., Komaki, G., Ishikawa, T, Suzuki, M, Watanabe, Y., Ando, T., Higuchi, S., Arinami, T. (2011). Functional polymorphism in the GPR55 gene is associated with anorexia nervosa. *Synapse.* 65 (2):103-8.
- Isokawa, M. (2009). Time-dependent induction of CREB phosphorylation in the hippocampus by the endogenous cannabinoid. *Neurosci Lett* 457 (1), 53-7.
- Itoh, Y., Kawamata, Y., Harada, M., Kobayashi, M., Fujii, R., Fukusumi, S., Ogi, K., Hosoya, M., Tanaka, Y., Uejima, H., Tanaka, H., Maruyama, M., Satoh, R., Okubo, S., Kizawa, H., Komatsu, H., Matsumura, F., Noguchi, Y., Shinohara, T., Hinuma, S., Fujisawa, Y., Fujino, M. (2003). Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature* 422 (6928), 173-6.
- Ivarsson, R., Quintens, R., Dejonghe, S., Tsukamoto, K., in't Veld, P., Renström, E., Schuit, F.C. (2005). Redox control of exocytosis: regulatory role of NADPH, thioredoxin, and glutaredoxin. *Diabetes.* 54(7):2132-42.

- Jagerovic, N., Hernandez-Folgado, L., Alkorta, I., Goya, P., Navarro, M., Serrano, A., Rodriguez de Fonseca, F., Dannert, M.T., Alsasua, A., Suardiaz, M., Pascual, D., Martín, M.I. (2004). Discovery of 5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-3-hexyl-1h-1,2,4-triazole, a novel *in vivo* cannabinoid antagonist containing a 1,2,4-triazole motif. *J Med Chem* 47 (11), 2939-42.
- Jamal, A.M., Lipsett, M., Sladek, R., Laganière, S., Hanley, S., Rosenberg, L. (2005). Morphogenetic plasticity of adult human pancreatic islets of Langerhans. *Cell Death Differ* 12 (7), 702-12.
- Jambal, P., Masterson, S., Nesterova, A., Bouchard, R., Bergman, B., Hutton, J.C., Boxer, L.M., Reusch, J.E., Pugazhenti, S. (2003). Cytokine-mediated down-regulation of the transcription factor cAMP-response element-binding protein in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem*. 278(25):23055-65.
- Janson, J., Ashley, R.H., Harrison, D., McIntyre, S., Butler, P.C. (1999). The mechanism of islet amyloid polypeptide toxicity is membrane disruption by intermediate-sized toxic amyloid particles. *Diabetes*. 48(3):491-8.
- Janikiewicz, J., Hanzelka, K., Kozinski, K., Kolczynska, K., Dobrzyn, A. (2015). Islet β -cell failure in type 2 diabetes--Within the network of toxic lipids. *Biochem Biophys Res Commun* 460 (3), 491-6.
- J arai, Z., Wagner, J.A., Varga, K., Lake, K.D., Compton, D.R., Martin, B.R., Zimmer, A.M., Bonner, T.I., Buckley, N.E., Mezey, E., Razdan, R.K., Zimmer, A., Kunos, G. (1999). Cannabinoid-induced mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB1 or CB2 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (24), 14136-41.
- Je ek, P., Dlaskov a, A., Plecit a-Hlavat a, L. (2012). Redox homeostasis in pancreatic β cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2012:932838.
- Jhala, U.S., Canettieri, G., Sreaton, R.A., Kulkarni, R.N., Krajewski, S., Reed, J., Walker, J., Lin, X., White, M., Montminy, M. (2003). cAMP promotes pancreatic beta-cell survival via CREB-mediated induction of IRS2. *Genes Dev*. 17(13):1575-80.
- Jin, S.M., Oh, B.J., Lee, S., Choi, J.M., Yang, S.J., Park, S.W., Kim, K.W., Kim, J.H., Park, C.Y. (2013). Reduced food intake is the major contributor to the protective effect of rimonabant on islet in established obesity-associated type 2 diabetes. *Yonsei Med J*. 54 (5):1127-36.

- Juan-Picó, E., Fuente, E., Bermúdez-Silva, F.J., Diaz-Molina, F.J., Ripoll, C., de Fonseca, F.R., *et al.* (2006). Cannabinoid receptors regulate Ca^{2+} signals and insulin secretion in pancreatic beta-cell. *Cell Calcium* 39, 155-62.
- Johns, D.G., Behm, D.J., Walker, D.J., Ao, Z., Shapland, E.M., Daniels, D.A., Riddick, M., Dowell, S., Staton, P.C., Green, P., Shabon, U., Bao, W., Aiyar, N., Yue, T.L., Brown, A.J., Morrison, A.D., Douglas S.A. (2007). The novel endocannabinoid receptor GPR55 is activated by atypical cannabinoids but does not mediate their vasodilator effects. *Br J Pharmacol* 152 (5), 825-31.
- Johson, F.B., Sinclair, D.A., Guarente, L. (1999). Molecular biology of aging. *Cell* 96, 291-302.
- Jones, P.M., Persaud, S.J., Howell, S.L. (1991). Protein kinase C and the regulation of insulin secretion from pancreatic B cells. *J Mol Endocrinol* 6 (2), 121-7.
- Jones, P.M., Persaud, S.J., Howell, S.L. (1992). Ca^{2+} -induced insulin secretion from electrically permeabilized islets. Loss of the Ca^{2+} -induced secretory response is accompanied by loss of Ca^{2+} -induced protein phosphorylation. *Biochem J* 285 (3), 973-8.
- Jourdan, T., Godlewski, G., Cinar, R., Bertola, A., Szanda, G, Liu, J., Tam, J., Han, T., Mukhopadhyay, B, Skarulis, M.C., Ju, C., Aouadi, M., Czech, M.P., Kunos, G. (2013). Activation of the Nlrp3 inflammasome in infiltrating macrophages by endocannabinoids mediates beta cell loss in type 2 diabetes. *Nat Med.* 19 (9):1132-40.
- Kahn, C.R., Roth, J. (2004). Berson, Yalow, and the JCI: the agony and the ecstasy. *J Clin Invest* 114 (8), 1051-4.
- Kahn, S.E., Montgomery, B., Howell, W., Ligueros-Saylan, M., Hsu, C.H., Devineni, D., McLeod, J.F., Horowitz, A., Foley, J.E. (2001). Importance of early phase insulin secretion to intravenous glucose tolerance in subjects with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 86 (12), 5824-9.
- Kahn, S.E., Hull, R.L., Utzschneider, K.M. (2006). Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 444 (7121), 840-6.
- Kaneto, H., Matsuoka, T.A., Nakatani, Y., Kawamori, D., Miyatsuka, T., Matsuhisa, M., Yamasaki, Y. (2005). Oxidative stress, ER stress, and the JNK pathway in type 2 diabetes. *J Mol Med (Berl)*. 83(6):429-39.

- Kapur, A., Zhao, P., Sharir, H., Bai, Y., Caron, M.G., Barak, L.S., Abood, M.E. (2009). Atypical responsiveness of the orphan receptor GPR55 to cannabinoid ligands. *J Biol Chem* 284 (43), 29817-27.
- Kargl, J., Brown, A.J., Andersen, L., Dorn, G., Schicho, R., Waldhoer, M., Heinemann, A. (2013). A selective antagonist reveals a potential role of G protein-coupled receptor 55 in platelet and endothelial cell function. *J Pharmacol Exp Ther* 346 (1), 54-66.
- Kawakami, R., Sawada, S.S., Lee, I.M., Matsushita, M., Gando, Y., Okamoto, T., Tsukamoto, K., Higuchi, M., Miyachi, M., Blair, S.N. (2015). Dynapenic Obesity and Prevalence of Type 2 Diabetes in Middle-Aged Japanese Men. *J Epidemiol.* 25(10):656-62.
- Keane, K.N., Cruzat, V.F., Carlessi, R., de Bittencourt, P.I. Jr, Newsholme, P. (2015). Molecular Events Linking Oxidative Stress and Inflammation to Insulin Resistance and β -Cell Dysfunction. *Oxid Med Cell Longev.* 181643 (1-15).
- Kiekens, R., In 't Veld, P., Mahler, T., Schuit, F., Van De Winkel, M., Pipeleers, D. (1992). Differences in glucose recognition by individual rat pancreatic B cells are associated with intercellular differences in glucose-induced biosynthetic activity. *J Clin Invest* 89 (1), 117-25.
- Kim, W., Doyle, M.E., Liu, Z., Lao, Q., Shin, Y.K., Carlson, O.D., Kim, H.S., Thomas, S., Napora, J.K., Lee, E.K., Moaddel, R., Wang, Y., Maudsley, S., Martin, B., Kulkarni, R.N., Egan, J.M. (2011). Cannabinoids inhibit insulin receptor signaling in pancreatic β -cells. *Diabetes.* 60 (4):1198-209.
- Kim, J.W., Roberts, C.D., Berg, S.A., Caicedo, A., Roper, S.D., Chaudhari, N. (2008). Imaging cyclic AMP changes in pancreatic islets of transgenic reporter mice. *PLoS One* 3 (5), e2127.
- Kim, W., Lao, Q., Shin, Y.K., Carlson, O.D., Lee, E.K., Gorospe, M., Kulkarni, R.N., Egan, J.M. (2012). Cannabinoids induce pancreatic β -cell death by directly inhibiting insulin receptor activation. *Sci Signal* 5, (216).
- King AJ. (2012). The use of animal models in diabetes research. *Br J Pharmacol* 166 (3), 877-94.
- Klinteberg, K., Karlsson, S., Moller, K., Sundler, F., Ahrén, B. (1996). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and insulin secretion: effects and mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 805, 543-8.

- Klumpers, L.E., Fridberg, M., de Kam, M.L., Little, P.B., Jensen, N.O., Kleinloog, H.D., Elling, C.E., van Gerven, J.M. (2013). Peripheral selectivity of the novel cannabinoid receptor antagonist TM38837 in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol.* 76 (6):846-57.
- Kola, B., Boscaro, M., Rutter, G.A., Grossman, A.B., Korbonits, M. (2006). Expanding role of AMPK in endocrinology. *Trends Endocrinol Metab.* 17 (5):205-15.
- Komatsu, M., Takei, M., Ishii, H., Sato, Y. (2013). Glucose-stimulated insulin secretion: A newer perspective. *J Diabetes Investig* 4 (6), 511-6.
- Kono, H., Rock, K.L. (2008). How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol.* 8 (4):279-89.
- Kotsikorou, E., Madrigal, K.E., Hurst, D.P., Sharir, H., Lynch, D.L., Heynen-Genel, S., Milan, L.B., Chung, T.D., Seltzman, H.H., Bai, Y., Caron, M.G., Barak, L., Abood, M.E., Reggio, P.H. (2011). Identification of the GPR55 agonist binding site using a novel set of high-potency GPR55 selective ligands. *Biochemistry* 50 (25), 5633-47.
- Kovacina, K.S., Park, G.Y., Bae, S.S., Guzzetta, A.W., Schaefer, E., Birnbaum, M.J., Roth, R.A. (2003). Identification of a proline-rich Akt substrate as a 14-3-3 binding partner. *J Biol Chem.* 278 (12):10189-94.
- Krishnan, K., Ma, Z., Björklund, A., Islam, M.S. (2015). Calcium signaling in a genetically engineered human pancreatic β -cell line. *Pancreas* 44 (5), 773-7.
- Krook, A., Zierath, J.R. (2009). Specificity of insulin signalling in human skeletal muscle as revealed by small interfering RNA. *Diabetologia* 52 (7), 1231-9.
- Kruszynska, Y.T., Worrall, D.S., Ofrecio, J., Frias, J.P., Macaraeg, G., Olefsky, J.M. (2002). Fatty acid-induced insulin resistance: decreased muscle PI3K activation but unchanged Akt phosphorylation. *J Clin Endocrinol Metab.* 87 (1):226-34.
- Kulkarni, R.N., Jhala, U.S., Winnay, J.N., Krajewski, S., Montminy, M., Kahn, C.R. (2004). PDX-1 haploinsufficiency limits the compensatory islet hyperplasia that occurs in response to insulin resistance. *J Clin Invest.* 114(6):828-36.

- Kwon, G., Marshall, C.A., Pappan, K.L., Remedi, M.S., McDaniel, M.L. (2004). Signalling elements involved in the metabolic regulation of mTOR by nutrients, incretins, and growth factors in islets. *Diabetes* 53(3), S225-S232.
- Kunos, G., Osei-Hyiaman, D., Bátkai, S., Sharkey, K.A., Makriyannis, A. (2008). Should peripheral CB(1) cannabinoid receptors be selectively targeted for therapeutic gain? *Trends Pharmacol Sci.* 30(1):1-7.
- Kunos, G., Tam, J. (2011). The case for peripheral CB₁ receptor blockade in the treatment of visceral obesity and its cardiometabolic complications. *Br J Pharmacol.* 163 (7):1423-31.
- Lacy, P.E., Kostianovsky, M. (1967). Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 16 (1), 35-9.
- Lacraz, G., Figeac, F., Movassat, J., Kassis, N., Coulaud, J., Galinier, A., Leloup, C., Bailbé, D., Homo-Delarche, F., Portha, B. (2009). Diabetic beta-cells can achieve self-protection against oxidative stress through an adaptive up-regulation of their antioxidant defenses. *PLoS One.* 4(8):e6500.
- Laplante, M., Sabatini, D.M. (2009). mTOR Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1, 4 (2).
- Laubner, K., Kieffer, T.J., Lam, N.T., Niu, X., Jakob, F., Seufert, J. (2005). Inhibition of preproinsulin gene expression by leptin induction of supresor of cytokine signalling 3 in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 54, 3410-3417.
- Lauckner, J.E., Jensen, J.B., Chen, H.Y., Lu, H.C., Hille, B., Mackie, K. (2008). GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proc Natl Acad Sci USA* 105 (7), 2699-704.
- Laybutt, D.R., Weir, G.C., Kaneto, H., Lebet, J., Palmiter, R.D., Sharma, A., Bonner-Weir, S. (2002). Overexpression of c-Myc in beta-cells of transgenic mice causes proliferation and apoptosis, downregulation of insulin gene expression, and diabetes. *Diabetes.* 51(6):1793-804.
- Le Marchand-Brustel, Y., Gual, P., Grémeaux, T., Gonzalez, T., Barrès, R., Tanti, J.F. (2003). Fatty acid-induced insulin resistance: role of insulin receptor substrate 1 serine phosphorylation in the retroregulation of insulin signalling. *Biochem Soc Trans.* 31 (6):1152-6.

- Leclercq, I.A., Lebrun, V.A, Stärkel, P, Horsmans, Y.J. (2007). Intrahepatic insulin resistance in a murine model of steatohepatitis: effect of PPARgamma agonist pioglitazone. *Lab Invest.* 87 (1):56-65.
- Lee, Y., Jo, J., Chung, H.Y., Pothoulakis, C., Im, E. (2016). Endocannabinoids in the gastrointestinal tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 311 (4):G655-G666.
- Leibowitz, G., Cerasi, E., Ketzinel-Gilad, M. (2008). The role of mTOR in the adaptation and failure of beta-cells in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 10 Suppl 4:157-69.
- Leloup, C., Turrel-Cuzin, C., Magnan, C., Karaca, M., Castel, J., Carneiro, L., Colombani, A.L., Ktorza, A., Casteilla, L., Pénicaud, L. (2009). Mitochondrial reactive oxygen species are obligatory signals for glucose-induced insulin secretion. *Diabetes.* 58 (3):673-81.
- Leney, S.E., Tavaré, J.M. (2009). The molecular basis of insulin-stimulated glucose uptake: signalling, trafficking and potential drug targets. *J Endocrinol* 203 (1), 1-18.
- Lenzen, S. (2008). The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia.* 51 (2):216-26.
- Lenzen, S. (2008). Oxidative stress: the vulnerable beta-cell. *Biochemical Society Transactions* 36, 343-347.
- Levendal, R.A., Schumann, D., Donath, M., Frost, C.L. (2012). Cannabis exposure associated with weight reduction and β -cell protection in an obese rat model. *Phytomedicine.* 19 (7):575-82.
- Li, C., Bowe, J. E., Jones, P. M., Persaud, S. J. (2010). Expression and function of cannabinoid receptors in mouse islets. *Islets* 2, 293-302.
- Li, C., Bowe, J. E., Huang, C., Amiel, A., Jones, P. M., Persaud, S. J. (2011). Cannabinoid receptor agonists and antagonists stimulate insulin secretion from isolated human islets of Langerhans. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 13, 903-910.
- Li, C., Najafi, H., Daikhin, Y., Nissim, I.B., Collins, H.W., Yudkoff, M., Matschinsky, F.M., Stanley, C.A. (2003). Regulation of leucine-stimulated insulin secretion and glutamine metabolism in isolated rat islets. *J Biol Chem* 278 (5), 2853-8.

- Lim, E.L., Hollingsworth, K.G., Aribisala, B.S., Chen, M.J., Mathers, J.C, Taylor, R. (2011). Reversal of type 2 diabetes: normalisation of beta cell function in association with decreased pancreas and liver triacylglycerol. *Diabetologia*. 54 (10):2506-14.
- Limon Pacheco, J., Gonsebatt, M.E. (2009). The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research* 674, 137-147.
- Lin, X.H., Yuece, B., Li, Y.Y., Feng, Y.J., Feng, J.Y., Yu, L.Y., Li, K., Li, Y.N., Storr, M. (2011). A novel CB receptor GPR55 and its ligands are involved in regulation of gut movement in rodents. *Neurogastroenterol Motil* (9), 862-e342.
- Liu, B., Song, S., Jones, P.M., Persaud S.J. (2014). GPR55: from orphan to metabolic regulator? *Pharmacol Ther* 145, 35-42.
- Liu, B., Song, S., Ruz-Maldonado, I., Pingitore, A., Huang, G.C., Baker, D., Jones, P.M., Persaud, S.J. (2016). GPR55-dependent stimulation of insulin secretion from isolated mouse and human islets of Langerhans. *Diabetes Obes Metab*. In press. (doi: 10.1111/dom.12780)
- Liu, Y.L., Connoley, I.P., Wilson, C.A., Stock, M.J. (2005). Effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist SR 141716 on oxygen consumption and soleus muscle glucose uptake in Lep (ob)/Lep(ob) mice. *Int J Obes* 29, 183-7.
- Liu, Q.R., Liu, J.M., Chen, Y., Xie, X.Q., Xiong, X.X., Qiu, X.Y., Pan, F., Liu, D., Yu, S.B., Chen, X.Q. (2014). Piperlongumine inhibits migration of glioblastoma cells via activation of ROS-dependent p38 and JNK signaling pathways. *Oxid Med Cell Longev*. 653732-44.
- Lonze, B.E., Riccio, A., Cohen, S., Ginty, D.D. (2002) Apoptosis, axonal growth defects, and degeneration of peripheral neurons in mice lacking CREB. *Neuron*. 34(3):371-85.
- Lortz, S., Tiedge, M. (2003). Sequential inactivation of reactive oxygen species by combined overexpression of SOD isoforms and catalase in insulin-producing cells. *Free Radic Biol Med*. 34(6):683-8.

- Lu, V.B., Puhl, H.L., Ikeda, S.R. (2013). N-Arachidonyl glycine does not activate G protein-coupled receptor 18 signaling via canonical pathways. *Mol Pharmacol* 83, 267-82.
- Luo, Z., Saha, A.K., Xiang, X., Ruderman, N.B. (2005). AMPK, the metabolic syndrome and cancer. *Trends Pharmacol Sci.* 26(2):69-76.
- Ma, L., Jia, J., Niu, W., Jiang, T., Zhai, Q., Yang, L., Bai, F., Wang, Q., Xiong, L. (2015). Mitochondrial CB1 receptor is involved in ACEA-induced protective effects on neurons and mitochondrial functions. *Sci. Rep.* 5, 12440
- Mackenzie, R.W., Elliott, B.T. (2014). Akt/PKB activation and insulin signaling: a novel insulin signaling pathway in the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 7:55-64.
- Malenczyk, K., Keimpema, E., Piscitelli, F., Calvigioni, D., Björklund, P., Mackie, K., Di Marzo, V., Hökfelt, T.G., Dobrzyn, A., Harkany, T. (2015). Fetal endocannabinoids orchestrate the organization of pancreatic islet microarchitecture. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112(45):E6185-94.
- Mackie, K., Hille, B. (1992). Cannabinoids inhibit N-Type Calcium Channels in Neuroblastoma Glioma-Cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 3825-9.
- MacDonald, M.J., Fahien, L.A. (1988). Glycerinaldehyde phosphate and methyl esters of succinic acid. Two "new" potent insulin secretagogues. *Diabetes* 37 (7), 997-9.
- Maedler, K., Sergeev, P., Ris, F., Oberholzer, J., Joller-Jemelka, H.I., Spinas, G.A., Kaiser, N., Halban, P.A., Donath, M.Y. (2002). Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J Clin Invest.* 110(6):851-60.
- Malenczyk, K., Jazurek, M., Keimpema, E., Silvestri, C., Janikiewicz, J., Mackie, K., Di Marzo, V., Redowicz, M.J., Harkany, T., Dobrzyn, A. (2013). CB1 cannabinoid receptors couple to focal adhesion kinase to control insulin release. *J Biol Chem.* 288 (45):32685-99.
- Martens, G.A., Cai, Y., Hinke, S., Stangé, G., Van de Casteele, M., Pipeleers, D. (2005). Glucose suppresses superoxide generation in metabolically responsive pancreatic beta cells. *J Biol Chem.* 280(21):20389-96.

- Massa, F., Storr, M., Lutz, B. (2005). The endocannabinoid system in the physiology and pathophysiology of the gastrointestinal tract. *J Mol Med* 83, 944-54.
- Mallat, A., Lotersztajn, S. (2006). Endocannabinoids as novel mediators of liver diseases. *J. Endocrinol Invest* 29, 58-65.
- Manning, B.D., Cantley, L.C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*. 129 (7):1261-74.
- Mantamadiotis, T., Lemberger, T., Bleckmann, S.C., Kern, H., Kretz, O., Martin Villalba, A., Tronche, F., Kellendonk, C., Gau, D., Kapfhammer, J., Otto, C., Schmid, W., Schütz, G. (2002). Disruption of CREB function in brain leads to neurodegeneration. *Nat Genet*. 31(1):47-54.
- Marchetti, P., Lupi, R., Lorenzetti, M., Giannareli, R., *et al.* (1998). Pancreatic glucagon damages isolated human islet function. *Transplantation Proceedings* 30, 397.
- Matias, I., Bisogno, T., Di Marzo, V. (2006). Endogenous cannabinoids in the brain and peripheral tissues: regulation of their levels and control of food intake. *Int J Obes* 30 (1), S7-S12.
- Matsui, T., Rosenzweig, A. (2005). Convergent signal transduction pathways controlling cardiomyocyte survival and function: the role of PI 3-kinase and Akt. *J Mol Cell Cardiol*. 38(1):63-71.
- Mayer, J.P., Zhang, F., DiMarchi, R.D. (2007). Insulin structure and function. *Biopolymers* 88 (5), 687-713.
- McHugh, D., Hu, S.S., Rimmerman, N., Juknat, A., Vogel, Z., Walker, J.M., Bradshaw, H.B. (2010). N-arachidonoyl glycine, an abundant endogenous lipid, potently drives directed cellular migration through GPR18, the putative abnormal cannabidiol receptor. *BMC Neurosci* 11: 44.
- McKillop, A.M., Moran, B.M., Abdel-Wahab, Y.H., Flatt, P.R. (2013). Evaluation of the insulin releasing and antihyperglycaemic activities of GPR55 lipid agonists using clonal beta-cells, isolated pancreatic islets and mice. *Br J Pharmacol* 170 (5), 978-90.

- McKillop, A.M., Moran, B.M., Abdel-Wahab, Y.H., Gormley, N.M., Flatt, P.R. (2016). Metabolic effects of orally administered small-molecule agonists of GPR55 and GPR119 in multiple low-dose streptozotocin-induced diabetic and incretin-receptor-knockout mice. *Diabetología* 59(12):2674-85.
- McClung, J.P., Roneker, C.A., Mu, W., Lisk, D.J., Langlais, P., Liu, F., Le,i X.G. (2004). Development of insulin resistance and obesity in mice overexpressing cellular glutathione peroxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101 (24):8852-7.
- Meda, P., Schuit, F. (2013). Glucose-stimulated insulin secretion: the hierarchy of its multiple cellular and subcellular mechanisms. *Diabetologia* 56 (12), 2552-5.
- Merino, B., Alonso-Magdalena, P., Lluesma, M., Ñeco, P., Gonzalez, A., Marroquí, L., García-Arévalo, M., Nadal, A., Quesada, I. (2015). Pancreatic alpha-cells from female mice undergo morphofunctional changes during compensatory adaptations of the endocrine pancreas to diet-induced obesity. *Sci. Rep* 5, 11622.
- Metz, S.A. (1988). Mobilization of cellular Ca²⁺ by lysophospholipids in rat islets of Langerhans. *Biochim Biophys Acta.* 968 (2):239-52.
- Mo, F.M., Offertáler, L., Kunos, G. (2004). Atypical cannabinoid stimulates endothelial cell migration via a Gi/Go-coupled receptor distinct from CB1, CB2 or EDG-1. *Eur J Pharmacol* 489 (1-2), 21-7.
- Moreno-Navarrete, J.M., Catalán, V., Whyte, L., Díaz-Arteaga, A., Vázquez-Martínez, R., Rotellar, F., Guzmán, R., Gómez-Ambrosi, J., Pulido, M.R., Russell, W.R., Imbernón, M., Ross, R.A., Malagón, M.M., Dieguez, C., Fernández-Real, J.M., Frühbeck, G., Nogueiras, R. (2012). The L- α -lysophosphatidylinositol/GPR55 system and its potential role in human obesity. *Diabetes* 61 (2), 281-91.
- Morgan, D., Oliveira-Emilio, H.R., Keane, D., Hirata, A.E., Santos da Rocha, M., Bordin, S., Curi, R., Newsholme, P., Carpinelli, A.R. (2007). Glucose, palmitate and pro-inflammatory cytokines modulate production and activity of a phagocyte-like NADPH oxidase in rat pancreatic islets and a clonal beta cell line. *Diabetologia* 50 (2), 359-69.

- Mukhopadhyay, P., Pan, H., Rajesh, M., Bátakai, S., Patel, V., Harvey-White, J., Mukhopadhyay, B., Haskó, G., Gao, B., Mackie, K., Pacher, P. (2010). CB1 cannabinoid receptors promote oxidative/nitrosative stress, inflammation and cell death in a murine nephropathy model. *Br J Pharmacol* 160 (3), 57-68.
- Munro, S., Thomas, K.L., Abu-Shaar, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365, 61-5.
- Muoio, D.M., Newgard, C.B. (2008). Mechanisms of disease: Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 (3), 193-205.
- Murphy, M.P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J.* 417 (1):1-13.
- Nadal, A., Quesada, I., Soria, B. (1999). Homologous and heterologous asynchronicity between identified alpha-, beta- and delta-cells within intact islets of Langerhans in the mouse. *J Physiol* 517 (1), 85-93.
- Newsholme, P., Haber, E.P., Hiraba, S.M., Rebelato, E., Procopio, J., Morgan, D., Oliveira-Emilio, H.C., Carpinelli, A.R., Curi, R. (2007). Diabetes associated cells stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. *Journal of Physiology* 583, 9-24.
- Newsholme, P., Morgan, D., Rebelato, E., Oliveira-Emilio, H.C., Procopio, J., Curi, R., Carpinelli, A. (2009). Insights into the critical role of NADPH oxidase(s) in the normal and dysregulated pancreatic beta cell. *Diabetologia* 52 (12), 2489-98.
- Newsholme, P., Rebelato, E., Abdulkader, F., Krause, M., Carpinelli, A.R., Curi, R. (2012). Reactive oxygen and nitrogen species generation, antioxidant defenses and beta-cell function: a critical role for amino acids. *Journal of Endocrinology* 214, 11-20.
- Nakata, M., Yada, T. (2008). Cannabinoids inhibit insulin secretion and cytosolic Ca²⁺ oscillation in islet beta-cells via CB1 receptors. *Regul Pept* 145, 49-53.

- Nakayama, M., Inoguchi, T., Sonta, T., Maeda, Y., Sasaki, S., Sawada, F., Tsubouchi, H., Sonoda, N., Kobayashi, K., Sumimoto, H., Nawata, H. (2005). Increased expression of NAD(P)H oxidase in islets of animal models of Type 2 diabetes and its improvement by an AT1 receptor antagonist. *Biochem Biophys Res Commun* 332 (4), 927-33.
- Nakao, C., Ookawara, T., Sato, Y., Kizaki, T., Imazeki, N., Matsubara, O., Haga, S., Suzuki, K., Taniguchi, N., Ohno, H. (2000). Extracellular superoxide dismutase in tissues from obese (ob/ob) mice. *Free Radic Res.* 33 (3):229-41.
- Nevalainen, T., Irving, A.J. (2010). GPR55, a lysophosphatidylinositol receptor with cannabinoid sensitivity? *Curr Top Med Chem.* 10 (8):799-813.
- Nicholson, K.M., Anderson, N.G. (2002). The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal.* 14 (5):381-95.
- Nikan, M., Nabavi, S.M., Manayi, A. (2016). Ligands for cannabinoid receptors, promising anticancer agents. *Life Sci.* 146:124-30.
- Ning, Y., O'Neill, K., Lan, H., Pang, L., Shan, L.X., Hawes, B.E., Hedrick, J.A. (2008). Endogenous and synthetic agonists of GPR119 differ in signalling pathways and their effects on insulin secretion in MIN6c4 insulinoma cells. *Br J Pharmacol.* 155 (7):1056-65.
- Ning, J., Xi, G., Clemmons, D.R. (2011). Suppression of AMPK activation via S485 phosphorylation by IGF-I during hyperglycemia is mediated by AKT activation in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology.* 152(8):3143-54.
- Nishikawa, S., Yasoshima, A., Doi, K., Nakayama, H., Uetsuka, K. (2007). Involvement of sex, strain and age factors in high fat diet-induced obesity in C57BL/6J and BALB/cA mice. *Exp Anim* 56 (4), 263-72.
- Nissen, S.E., Nicholls, S.J., Wolski, K., Rodés-Cabau, J., Cannon, C.P., Deanfield, J.E., Després, J.P., Kastelein, J.J., Steinhubl, S.R., Kapadia, S., Yasin, M., Ruzyllo, W., Gaudin, C., Job, B., Hu, B., Bhatt, D.L., Lincoff, A.M., Tuzcu, E.M; STRADIVARIUS Investigators. (2008). Effect of rimonabant on progression of atherosclerosis in patients with abdominal obesity and coronary artery disease: the STRADIVARIUS randomized controlled trial. *JAMA.* 299 (13):1547-60.

- Nogueiras, R., Veyrat-Durebex, C., Suchanek, P.M., Klein, M., Tschöp, J., Caldwell, C., Woods, S.C., Wittmann, G., Watanabe, M., Liposits, Z., Fekete, C., Reizes, O., Rohner-Jeanrenaud, F., Tschöp, M.H. (2008). Peripheral, but not central, CB1 antagonism provides food intake-independent metabolic benefits in diet-induced obese rats. *Diabetes*. 57 (11):2977-91.
- Núñez, E., Benito, C., Pazos, M.R., Barbachano, A., Fajardo, O., González, S., et al. (2004). Cannabinoid CB2 receptors are expressed by perivascular microglial cells in the human brain: An immunohistochemical study. *Synapse* 53, 208-13.
- Obara, Y., Ueno, S., Yanagihata, Y., Nakahata, N. (2011). Lysophosphatidylinositol causes neurite retraction via GPR55, G13 and RhoA in PC12 cells. *PLoS One*- 6(8):e24284.
- Offertáler, L., Mo, F.M., Bátkai, S., Liu, J., Begg, M., Razdan, R.K., Martin, B.R., Bukoski, R.D., Kunos, G. (2003). Selective ligands and cellular effectors of a G protein-coupled endothelial cannabinoid receptor. *Mol Pharmacol* 63 (3), 699-705.
- Oka, S., Nakajima, K., Yamashita, A., Kishimoto, S., Sugiura, T. (2007). Identification of GPR55 as a lysophosphatidylinositol receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 362 (4), 928-34.
- Oka, S., Toshida, T., Maruyama, K., Nakajima, K., Yamashita, A., Sugiura, T. (2009). 2-Arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphoinositol: a possible natural ligand for GPR55. *J Biochem* 145 (1), 13-20.
- Oh, Y.S. (2015). Mechanistic insights into pancreatic beta-cell mass regulation by glucose and free fatty acids. *Anat Cell Biol*. 48 (1):16-24.
- Ohsugi, M., Cras-Méneur, C., Zhou, Y., Bernal-Mizrachi, E., Johnson, J.D., Luciani, D.S., Polonsky, K.S., Permutt, M.A. (2005). Reduced expression of the insulin receptor in mouse insulinoma (MIN6) cells reveals multiple roles of insulin signaling in gene expression, proliferation, insulin content, and secretion. *J Biol Chem*. 280 (6):4992-5003.
- O'Neill, H.M. (2013). AMPK and Exercise: Glucose Uptake and Insulin Sensitivity. *Diabetes Metab J*. 37 (1):1-21.
- Orci, L. (1976). The microanatomy of the islets of Langerhans. *Metabolism* 11 (1), 1303-13.

- Osei-Hyiaman, D., DePetrillo, M., Pacher, P., Liu, J., Radaeva, S., Batkai, S., *et al.* (2005). Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J Clin Invest* 115, 1298-305.
- O'Sullivan, S.E., Sun, Y., Bennett, A.J., Randall, M.D., Kendall, D.A. (2009). Time-dependent vascular actions of cannabidiol in the rat aorta. *Eur J Pharmacol* 612 (1-3), 61-8.
- Ozaita, A., Puighermanal, E., Maldonado, R. (2007). Regulation of PI3K/Akt/GSK-3 pathway by cannabinoids in the brain. *J Neurochem* 102(4), 1105-14.
- Ozcan, U., Ozcan, L., Yilmaz, E., Düvel, K., Sahin, M., Manning, B.D., Hotamisligil, G.S. (2008). Loss of the tuberous sclerosis complex tumor suppressors triggers the unfolded protein response to regulate insulin signaling and apoptosis. *Mol Cell*. 29(5):541-51.
- Pagotto, U., Marsicano, G., Cota, D., Lutz, B., Pasquali, R. (2006). The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr Rev* 27, 73-100.
- Pajvani, U.B., Accili, D. (2015). The new biology of diabetes. *Diabetologia* 58 (11), 2459-68.
- Palomba, L., Silvestri, C., Imperatore, R., Morello, G., Piscitelli, F., Martella, A., Cristino, L., Di Marzo, V. (2015). Negative Regulation of Leptin-induced Reactive Oxygen Species (ROS) Formation by Cannabinoid CB1 Receptor Activation in Hypothalamic Neurons. *J Biol Chem*. 290 (22):13669-77.
- Paris, M., Bernard-Kargar, C., Berthault, M.F., Bouwens, L., *et al.* (2003). Specific and combined effects of insulin and glucose on functional pancreatic beta-cell mass in vivo in adult rats. *Endocrinology* 144, 2717-2727.
- Park, S.Y., Cho, Y.R., Kim, H.J., Higashimori, T., Danton, C., Lee, M.K., Dey, A., Rothermel, B., Kim, Y.B., Kalinowski, A., Russell, K.S., Kim, J.K. (2005). Unraveling the temporal pattern of diet-induced insulin resistance in individual organs and cardiac dysfunction in C57BL/6 mice. *Diabetes* 54 (12), 3530-40.

- Park, E.M., Cho, S. (2006). Enhanced ERK dependent CREB activation reduces apoptosis in staurosporine-treated human neuroblastoma SK-N-BE(2)C cells. *Neurosci Lett.* 402(1-2):190-4.
- Papaccio, G. (1993). Early insulinitis and the islet vascular system. *Diabetologia* 36 (7), 682-3.
- Pavon, F.J., Bilbao, A., Hernández-Folgado, L., Cippitelli, A., Jagerovic, N., Abellán, G., Rodríguez-Franco, M.A., Serrano, A., Macias, M., Gómez, R., Navarro, M., Goya, P., Rodríguez de Fonseca, F. (2006). Antiobesity effects of the novel in vivo neutral cannabinoid receptor antagonist 5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-3-hexyl-1H-1,2,4-triazole-LH 21. *Neuropharmacology.* 51 (2):358-66.
- Pavón, F.J., Serrano, A., Pérez-Valero, V., Jagerovic, N., Hernández-Folgado, L., Bermúdez-Silva, F.J., Macías, M., Goya, P., de Fonseca, F.R. (2008). Central versus peripheral antagonism of cannabinoid CB1 receptor in obesity: effects of LH-21, a peripherally acting neutral cannabinoid receptor antagonist, in Zucker rats. *J Neuroendocrinol.* 20(1):116-23.
- Persaud, S.J., Jones, P.M., Howell, S.L. (1990). Glucose-stimulated insulin secretion is not dependent on activation of protein kinase A. *Biochem Biophys Res Commun* 173 (3), 833-9.
- Persaud, S.J., Muller, D., Belin, V.D., Kitsou-Mylona, I., Asare-Anane, H., Papadimitriou, A., Burns, C.J., Huang, G.C., Amiel, S.A., Jones, P.M. (2007). The role of arachidonic acid and its metabolites in insulin secretion from human islets of langerhans. *Diabetes.* 56 (1):197-203.
- Persaud, S.J., Liu, B., Sampaio, H.B., Jones, P.M., Muller, D.S. (2011). Calcium/calmodulin-dependent kinase IV controls glucose-induced Irs2 expression in mouse beta cells via activation of cAMP response element-binding protein. *Diabetologia.* 54 (5):1109-20.
- Persaud, S.J., Liu, B., Jones, P.M. (2012). Functional analysis of human islets of Langerhans maintained in culture. *Methods Mol Biol* 806, 55-71.
- Pfeifer, C.R., Shomorony, A., Aronova, M.A., Zhang, G., Cai, T., Xu, H., Notkins, A.L., Leapman, R.D. (2015). Quantitative analysis of mouse pancreatic islet architecture by serial block-face SEM. *J Struct Biol* 189 (1), 44-52.

- Pende, M., Kozma, S.C., Jaquet, M., *et al.* (2000). Hypoinsulinemia, glucose intolerante and diminished beta-cell size in S6K1-deficient mice. *Nature* 408, 994-997.
- Pertwee, R.G. (1997). Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther.* 74(2):129-80.
- Pertwee, R. G. (2005). Pharmacological actions of cannabinoids. *Handb Exp Pharmacol* 168, 1-51.
- Pertwee, R.G. (2001). Cannabinoids and the gastrointestinal tract. *Gut.* 48 (6):859-67.
- Pertwee, R.G., Howlett, A.C., Abood, M.E., Alexander, S.P., Di Marzo, V., Elphick, M.R., Greasley, P.J., Hansen, H.S., Kunos, G., Mackie, K, Mechoulam, R., Ross, R.A. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB₁ and CB₂. *Pharmacol Rev.* 62(4):588-631.
- Pick, A., Clark, J., Kubstrup, C., Levisetti, M., Pugh, W., Bonner-Weir, S., Polonsky, K.S. (1998). Role of apoptosis in failure of beta-cell mass compensation for insulin resistance and beta-cell defects in the male Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes.* 147 (3):358-64.
- Piñeiro, R., Maffucci, T., Falasca, M. (2011). The putative cannabinoid receptor GPR55 defines a novel autocrine loop in cancer cell proliferation. *Oncogene* 30, 142-52.
- Pipeleers, D.G. (1992). Heterogeneity in pancreatic beta-cell population. *Diabetes* 41 (7), 777-81.
- Pi, J., Zhang, Q., Fu, J., Woods, C.G., Hou, Y., Corkey, B.E., Collins, S., Andersen, M.E. (2010). ROS signaling, oxidative stress and Nrf2 in pancreatic beta-cell function. *Toxicol Appl Pharmacol.* 244(1):77-83.
- Pi-Sunyer, F.X., Aronne, L.J., Heshmati, H.M., Devin, J., Rosenstock, J.; RIO-North America Study Group.. (2006). Effect of rimonabant, a cannabinoid-1 receptor blocker, on weight and cardiometabolic risk factors in overweight or obese patients: RIO-North America: a randomized controlled trial. *JAMA.* 295 (11):1252.
- Polonsky, K.S. (2000). Dynamics of insulin secretion in obesity and diabetes. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24 (2), 29-31.

- Puighermanal, E., Marsicano, G., Busquets-Garcia, A., Lutz, B., Maldonado, R., Ozaita, A. (2009). Cannabinoid modulation of hippocampal long-term memory is mediated by mTOR signaling. *Nat Neurosci* 12 (9), 1152-8.
- Purves, T., Middlemas, A., Agthong, S., Jude, E.B., Boulton, A.J., Fernyhough, P., Tomlinson, D.R. (2001). A role for mitogen-activated protein kinases in the etiology of diabetic neuropathy. *FASEB J.* 15(13):2508-14.
- Quesada, I., Tudurí, E., Ripoll, C., Nadal, A. (2008). Physiology of the pancreatic alpha-cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. *J Endocrinol* 199 (1), 5-19.
- Quesada, I., Todorova, M.G., Alonso-Magdalena, P., Beltrá, M., Carneiro, E.M., Martín, F., Nadal, A., Soria, B. (2006). Glucose induces opposite intracellular Ca²⁺ concentration oscillatory patterns in identified alpha- and beta-cells within intact human islets of Langerhans. *Diabetes* 55(9), 2463-9.
- Qin, N., Neepser, M.P., Liu, Y., Hutchinson, T.L., Lubin, M.L., Flores, CM. (2008). TRPV2 is activated by cannabidiol and mediates CGRP release in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci* 28 (24), 6231-8.
- Quinlan, C.L., Orr, A.L., Perevoshchikova, I.V., Treberg, J.R., Ackrell, B.A., Brandm M.D. (2012). Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions. *J Biol Chem.* 287(32):27255-64.
- Quinlan, C.L., Perevoshchikova, I.V., Hey-Mogensen, M., Orr, A.L., Brand, M.D. (2013). Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates. *Redox Biol.* 1:304-12.
- Rajaraman, G., Simcocks, A., Hryciw, D.H., Hutchinson, D.S., McAinch, A.J. (2016). G protein coupled receptor 18: A potential role for endocannabinoid signaling in metabolic dysfunction. *Mol Nutr Food Res.* 60 (1):92-102.
- Rajesh, M., Bátkai, S., Kechrid, M., Mukhopadhyay, P., Lee, W.S., Horváth, B., Holovac, E., Cinar, R., Liaudet, L., Mackie, K., Haskó, G., Pacher, P. (2012). Cannabinoid 1 receptor promotes cardiac dysfunction, oxidative stress, inflammation, and fibrosis in diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* 61 (3), 716-27.

- Raught, B., Peiretti, F., Gingrass, A.C., Livingstone, M., *et al.* (2004). Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 4B Ser22 is modulated by S6 kinases. *EMBO J* 23, 1761-1769.
- Ravier, M.A., Güldenagel, M., Charollais, A., Gjinovci, A., Caille, D., Söhl, G., Wollheim, C.B., Willecke, K., Henquin, J.C., Meda, P. (2005). Loss of connexin36 channels alters beta-cell coupling, islet synchronization of glucose-induced Ca²⁺ and insulin oscillations, and basal insulin release. *Diabetes*. 54 (6):1798-807.
- Ravinet Trillou, C., Arnone, M., Delgorge, C., Gonalons, N., Keane, P., Maffrand, J.P., Soubrie, P. (2003). Anti-obesity effect of SR141716, a CB1 receptor antagonist, in diet-induced obese mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 284 (2):R345-53.
- Rebelato, E., Abdulkader, F., Curi, R., Carpinelli, A.R. (2011). Control of the intracellular redox state by glucose participates in the insulina secretin mechanism. *Plos One* 6, 8. e24507.
- Resstel, L.B., Tavares, R.F., Lisboa, S.F., Joca, S.R., Corrêa, F.M., Guimarães, F.S. (2009). 5-HT_{1A} receptors are involved in the cannabidiol-induced attenuation of behavioural and cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *Br J Pharmacol* 156 (1), 181-8.
- Riccio, A., Ahn, S., Davenport, C.M., Blendy, J.A., Ginty, D.D. (1999). Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons. *Science* 286 (5448):2358-61.
- Rinaldi-Carmona, M., Barth, F., Héaulme, M., Shire, D., Calandra, B., Congy, C., Martínez, S., Maruani, J., Néliat, G., Caput, D., *et al.* (1994). SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett* 350 (2-3), 240-4.
- Rhodes, C.J, White, M.F. (2002). Molecular insights into insulin action and secretion. *Eur J Clin Invest* 32 (3), 3-13.
- Rodriguez-Diaz, R., Dando, R., Jacques-Silva, M.C., Fachado, A., Molina, J., Abdulreda, M.H., Ricordi, C., Roper, S.D., Berggren, P.O., Caicedo, A. (2011). Alpha cells secrete acetylcholine as a non-neuronal paracrine signal priming beta cell function in humans. *Nat Med* 17 (7), 888-92.

- Romero-Zerbo, S.Y., Rafacho, A., Díaz-Arteaga, A., Suárez, J., Quesada, I., Imbernon, M., Ross, R.A., Dieguez, C., Rodríguez de Fonseca, F., Nogueiras, R., Nadal, A., Bermúdez-Silva, F.J. (2011). A role for the putative cannabinoid receptor GPR55 in the islets of Langerhans. *J Endocrinol. Nov*; 211(2):177-85.
- Robertson, R.P., Zhang, H.J., Pyzdrowski, K.L., Walseth, T.F. (1992). Preservation of insulin mRNA levels and insulina secretion in HIT cells by avoidance of chronic exposure to high glucose concentrations. *Journal of Clinical Investigation* 90, 320-325.
- Robertson, R.P. (2004). Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J Biol Chem.* 279 (41):42351-4.
- Rebuffé-Scrive, M., Surwit, R., Feinglos, M., Kuhn, C., Rodin, J. (1993). Regional fat distribution and metabolism in a new mouse model (C57BL/6J) of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 42 (11), 1405-9.
- Rohrbach, K., Thomas, M.A., Glick, S., Fung, E.N., Wang, V., Watson, L., Gregory, P., Antel, J., Pellemounter, M.A. (2012). Ibinabant attenuates β -cell loss in male Zucker diabetic fatty rats independently of its effects on body weight. *Diabetes Obes Metab.* 14 (6):555-64.
- Rorsman, P., Eliasson, L., Renström, E., Gromada, J., Barg, S., Göpel, S. (2000). The Cell Physiology of Biphasic Insulin Secretion. *News Physiol Sci* 15, 72-77.
- Rossi, J., Santamäki, P., Airaksinen, M.S., Herzig, K.H. (2005). Parasympathetic innervation and function of endocrine pancreas requires the glial cell line-derived factor family receptor alpha2 (GFRalpha2). *Diabetes* 54 (5), 1324-30.
- Rosenstock, J., Hollander, P., Chevalier, S., Iranmanesh, A.; SERENADE Study Group. (2008). SERENADE: the Study Evaluating Rimonabant Efficacy in Drug-naive Diabetic Patients: effects of monotherapy with rimonabant, the first selective CB1 receptor antagonist, on glycemic control, body weight, and lipid profile in drug-naive type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 31 (11):2169-76.

- Ryberg, E., Larsson, N., Sjögren, S., Hjorth, S., Hermansson, N.O., Leonova, J., Elebring, T., Nilsson, K., Drmota, T., Greasley, P.J. (2007). The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol* 152, 1092-101.
- Ruderman, N., Prentki, M. (2004). AMP kinase and malonyl-CoA: targets for therapy of the metabolic syndrome. *Nat Rev Drug Discov.* 3 (4):340-51.
- Ruz Maldonado, I., Pingitore, A., Liu, B., Huang, G.C., Baker, D., Bermúdez-Silva, F.J., Persaud, S.J. (2015). Stimulation of insulin secretion by cannabinoid ligands LH-21 and Abn-CBD in mouse and human islets: evaluation of the role of GPR55. *51st EASD Annual Meeting*, Stockholm, Sweden, 14-18 September 2015.
- Sajan, M.P., Ivey, R.A, Farese, R.V. (2015). BMI-related progression of atypical PKC-dependent aberrations in insulin signaling through IRS-1, Akt, FoxO1 and PGC-1 α in livers of obese and type 2 diabetic humans. *Metabolism* 64 (11), 1454-65.
- Sakai, K., Matsumoto, K., Nishikawa, T., Suefuji, M., Nakamaru, K., Hirashima, Y., Kawashima, J., Shirotani, T., Ichinose, K., Brownlee, M., Araki, E. (2003). Mitochondrial reactive oxygen species reduce insulin secretion by pancreatic beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 300(1):216-22.
- Santos, R.M., Rosario, L.M., Nadal, A., Garcia-Sancho, J., Soria, B., Valdeolmillos, M. (1991). Widespread synchronous [Ca²⁺]_i oscillations due to bursting electrical activity in single pancreatic islets. *Pflugers Arch* 418 (4), 417-22.
- Samols, E., Stagner, J.I., Ewart, R.B., Marks, V. (1988). The order of islet microvascular cellular perfusion is B----A----D in the perfused rat pancreas. *J Clin Invest* 82 (1), 350-3.
- Salomon, D., Meda, P. (1986). Heterogeneity and contact-dependent regulation of hormone secretion by individual β cells. *Exp Cell Res* 162 (2), 507-20.
- Sarkar, S.A., Gunter, J., Bouchard, R., Reusch, J.E., Wiseman, A., Gill, R.G., Hutton, J.C., Pugazhenthii, S. (2007). Dominant negative mutant forms of the cAMP response element binding protein induce apoptosis and decrease the anti-apoptotic action of growth factors in human islets. *Diabetologia.* 50 (8):1649-59.

- Sato, Y., Aizawa, T., Komatsu, M., Okada, N., Yamada, T. (1992). Dual functional role of membrane depolarization/Ca²⁺ influx in rat pancreatic B-cell. *Diabetes* 41 (4), 438-43.
- Saucedo, L.J., Gao, X., Chiarelli, D.A., Ali, S.M., *et al.* (2003). Rheb promotes cell growth as a component of the insulin/mTOR signalling network. *Nat Cell Biol* 5, 566-571.
- Sawzdargo, M., Nguyen, T., Lee, D.K., Lynch, K.R., Cheng, R., Heng, H.H., George, S.R., O'Dowd, B.F. (1999). Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, PsiGPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain. *Brain Res Mol Brain Res* 64 (2), 193-8.
- Sener, A., Malaisse, W.J. (2002). The stimulus-secretion coupling of amino acid-induced insulin release. Insulinotropic action of L-alanine. *Biochim Biophys Acta* 1573 (1), 100-4.
- Schwartz, I.L. (1973). Solomon A. Berson and Rosalyn S. Yalow: a scientific appreciation. *Mt Sinai J Med* 40 (3), 284-94.
- Sengupta, S., Peterson, T.R., Sabatini, D.M. (2010). Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Mol Cell* 40, 310-322.
- Sharir, H., Abood, M.E. (2010). Pharmacological characterization of GPR55, a putative cannabinoid receptor. *Pharmacol Ther* 126 (3), 301-13.
- Sharp, G.W. (1979). The adenylate cyclase-cyclic AMP system in islets of Langerhans and its role in the control of insulin release. *Diabetologia* 16 (5), 287-96.
- Shimomura, I., Hammer, R.E., Richardson, J.A., Ikemoto, S., Bashmakov, Y., *et al.* (1998). Insulin resistance and diabetes mellitus in transgenic mice expressing nuclear SREBP-1c in adipose tissue: model for congenital generalized lipodystrophy. *Genes Dev* 12, 3182-3194.
- Shimomura, I., Matsuda, M., Hammer, R.E., *et al.* (2000). Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. *Mol Cell* 6, 77-86.

- Scheen, A.J., Van Gaal, L.G., Després, J.P., Pi-Sunyer, X., Golay, A., Hanotin, C. (2006). [Rimonabant improves cardiometabolic risk profile in obese or overweight subjects: overview of RIO studies]. *Rev Med Suisse*. 2 (76):1916-23.
- Skaper, S.D., Buriani, A., Dal Toso, R., Petrelli, L., Romanello, S., Facci, L., *et al.* (1996). The ALIamide palmitoyle-thanolamide and cannabinoids. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 3984-9.
- Skoglund, G., Basmaciogullari, A., Rouot, B., Marie, J.C., Rosselin, G. (1999). Cell-specific localization of G protein alpha-subunits in the islets of Langerhans. *J Endocrinol*. 162(1):31-7.
- Starowicz, K.M., Cristino, L., Matias, I., Capasso, R., Racioppi, A., Izzo, A.A., Di Marzo, V. (2008). Endocannabinoid dysregulation in the pancreas and adipose tissue of mice fed with a high-fat diet. *Obesity (Silver Spring)* 16 (3), 553-65.
- Steiner, D.J., Kim, A., Miller, K., Hara, M. (2010). Pancreatic islet plasticity: interspecies comparison of islet architecture and composition. *Islets* 2 (3), 135-45.
- Sugiura, T., Kodaka, T., Kondo, S., Tonegawa, T., Nakane, S., Kishimoto, S., *et al.* (1996). 2-AG, a putative endogenous cannabinoid receptor ligand, induces rapid, transient elevation of Ca²⁺ in neuroblastoma X glioma hybrid NG108-15 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 229, 58-64.
- Schicho, R., Bashashati, M., Bawa, M., McHugh, D., Saur, D., Hu, H.M., Zimmer, A., Lutz, B., Mackie, K., Bradshaw, H.B., McCafferty, D.M., Sharkey, K.A., Storr, M. (2011). The atypical cannabinoid O-1602 protects against experimental colitis and inhibits neutrophil recruitment. *Inflamm Bowel Dis* 17 (8), 1651-64.
- Schmuhl, E., Ramer, R., Salamon, A., Peters, K., Hinz, B. (2014). Increase of mesenchymal stem cell migration by cannabidiol via activation of p42/44 MAPK. *Biochem Pharmacol* 87 (3), 489-501.
- Scott, J.A., King, G.L. (2004). Oxidative stress and antioxidant treatment in diabetes. *Ann N Y Acad Sci*. 1031:204-13.
- Shigeto, M., Katsura, M., Matsuda, M., Ohkuma, S., Kaku, K. (2006). First phase of glucose-stimulated insulin secretion from MIN 6 cells does not always require extracellular calcium influx. *J Pharmacol Sci* 101 (4), 293-302.

- Simcocks, A.C., O'Keefe, L., Jenkin, K.A., Mathai, M.L., Hryciw, D.H., McAinch, A.J. (2014). A potential role for GPR55 in the regulation of energy homeostasis. *Drug Discov Today* 19 (8), 1145-51.
- Sisay, S., Pryce, G., Jackson, S.J., Tanner, C., Ross, R.A., Michael, G.J., Selwood, D.L., Giovannoni, G., Baker, D. (2013). Genetic background can result in a marked or minimal effect of gene knockout (GPR55 and CB2 receptor) in experimental autoimmune encephalomyelitis models of multiple sclerosis. *PLoS One*. 8 (10):e76907.
- Solinas, M., Goldberg, S.R. (2005). Motivational effects of cannabinoids and opioids on food reinforcement depend on simultaneous activation of cannabinoid and opioid systems. *Neuropsychopharmacology*. (11):2035-45.
- Spellman, C.W. (2007). Islet cell dysfunction in progression to diabetes mellitus. *J Am Osteopath Assoc* 107, S1-5.
- Srinivasan, S., Bernal-Mizrachi, E., Ohsugi, M., Permutt, M.A. (2002). Glucose promotes pancreatic islet beta-cell survival through a PI 3-kinase/Akt-signaling pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 283 (4):E784-93.
- Steinberg, M.S. (1963). Reconstruction of tissues by dissociated cells. Some morphogenetic tissue movements and the sorting out of embryonic cells may have a common explanation. *Science* 141 (3579), 401-8.
- Steinberg, M.S. (2007). Differential adhesion in morphogenesis: a modern view. *Curr Opin Genet Dev* 17 (4), 281-6.
- Steinberg, G.R., Watt, M.J., Ernst, M., Birnbaum, M.J., Kemp, B.E., Jørgensen, S.B. (2009). Ciliary neurotrophic factor stimulates muscle glucose uptake by a PI3-kinase-dependent pathway that is impaired with obesity. *Diabetes*. 58 (4):829-39.
- Steinberg, G.R., Kemp, B.E. (2009). AMPK in Health and Disease. *Physiol Rev*. 89(3):1025-78.
- Storgaard, H., Song, X.M., Jensen, C.B., Madsbad, S., Bjørnholm, M., Vaag, A., Zierath, J.R. (2001). Insulin signal transduction in skeletal muscle from glucose-intolerant relatives of type 2 diabetic patients [corrected]. *Diabetes*. 50 (12):2770-8.

- Storgaard, H., Jensen, C.B., Björnhholm, M., Song, X.M., Madsbad, S., Zierath, J.R., Vaag, A.A. (2004). Dissociation between fat-induced in vivo insulin resistance and proximal insulin signaling in skeletal muscle in men at risk for type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 89 (3):1301-11.
- Sylantsev, S., Jensen, T.P., Ross, R.A., Rusakov, D.A. (2013). Cannabinoid- and lysophosphatidylinositol-sensitive receptor GPR55 boosts neurotransmitter release at central synapses. *Proc Natl Acad Sci USA* 110 (13), 5193-8.
- Sun, Y., Norimoto, H., Pu, X.P., Matsuki, N., Ikegaya, Y. (2012). Cannabinoid receptor activation disrupts the internal structure of hippocampal sharp wave-ripple complexes. *J Pharmacol Sci.* 118(2):288-94.
- Surwit, R.S., Feinglos, M.N., Rodin, J., Sutherland, A., Petro, A.E., Opara, E.C., Kuhn, C.M., Rebuffé-Scrive, M. (1995). Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice. *Metabolism* 44 (5), 645-51.
- Tam, J., Vemuri, V.K., Liu, J., Bátkai, S., Mukhopadhyay, B., Godlewski, G., Osei-Hyiaman, D., Ohnuma, S., Ambudkar, S.V., Pickel, J., Makriyannis, A., Kunos, G. (2010). Peripheral CB1 cannabinoid receptor blockade improves cardiometabolic risk in mouse models of obesity. *J Clin Invest.* 120 (8):2953-66.
- Tam, J., Cinar, R., Liu, J., Godlewski, G., Wesley, D., Jourdan, T., Szanda, G., Mukhopadhyay, B., Chedester, L., Liow, J.S., Innis, R.B., Cheng, K., Rice, K.C., Deschamps, J.R., Chorvat, R.J., McElroy, J.F., Kunos, G. (2012). Peripheral cannabinoid-1 receptor inverse agonism reduces obesity by reversing leptin resistance. *Cell Metab.* 16(2):167-79.
- Tamarina, N.A., Kuznetsov, A., Rhodes, C.J., Bindokas, V.P., Philipson, L.H. (2005). Inositol (1,4,5)-trisphosphate dynamics and intracellular calcium oscillations in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 54 (11), 3073-81.
- Tanaka, Y., Tran, P.O., Harmon, J., Robertson, R.P. A role for glutathione peroxidase in protecting pancreatic beta cells against oxidative stress in a model of glucose toxicity. (2002). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99 (19):12363-8.

- Tasaka, Y., Matsumoto, H., Inoue, Y., Hirata, Y. (1989). Contents and secretion of glucagon and insulin in rat pancreatic islets from the viewpoint of their localization in pancreas. *Tohoku J Exp Med* 159 (2), 123-30.
- Tatulian, S.A. (2015). Structural Dynamics of Insulin Receptor and Transmembrane Signaling. *Biochemistry* 54 (36), 5523-32.
- Taylor, R. (2013) Banting Memorial lecture 2012: reversing the twin cycles of type 2 diabetes. *Diabet Med.* 30 (3):267-75.
- Tharp, W.G., Lee, Y.H., Maple, R.L., Pratley, R.E. (2008). The cannabinoid CB1 receptor is expressed in pancreatic delta-cells. *Biochem Biophys Res Commun* 372, 595-600.
- Thompson, M.D., Cole, D.E., Capra, V., Siminovitch, K.A., Rovati, G.E., Burnham, W.M., Rana B.K. (2014). Pharmacogenetics of the G protein-coupled receptors. *Methods Mol Biol* 1175, 189-242.
- Tiyerili, V., Zimmer, S., Jung, S., Wassmann, K., Naehle, C.P., Lütjohann, D., Zimmer, A., Nickenig, G., Wassmann, S. (2010). CB1 receptor inhibition leads to decreased vascular AT1 receptor expression, inhibition of oxidative stress and improved endothelial function. *Basic Res Cardiol* 105 (4), 465-77.
- Toker, A. (2012). Achieving specificity in Akt signaling in cancer. *Adv Biol Regul.* 52 (1):78-87.
- Toker, A., Marmiroli, S. (2014). Signaling specificity in the Akt pathway in biology and disease. *Adv Biol Regul.* 55:28-38.
- Topp, B.G., McArthur, M.D., Finegood, D.T. (2004). Metabolic adaptations to chronic glucose infusion in rats. *Diabetologia* 47, 1602-1610.
- Toyé, A.A., Lippiat, J.D., Proks, P., Shimomura, K., Bentley, L., Hugill, A., Mijat, V., Goldsworthy, M., Moir, L., Haynes, A., Quarterman, J., Freeman, H.C., Ashcroft, F.M., Cox, R.D. (2005). A genetic and physiological study of impaired glucose homeostasis control in C57BL/6J mice. *Diabetologia* 48 (4), 675-86.
- Tremblay, F., Marette, A. Amino acid and insulin signaling via the mTOR/p70 S6 kinase pathway. (2001). A negative feedback mechanism leading to insulin resistance in skeletal muscle cells. *J Biol Chem.* 276(41):38052-60.

- Tschopp, O., Yang, Z.Z., Brodbeck, D., Dummler, B.A., Hemmings-Mieszczak, M., Watanabe, T., Michaelis, T., Frahm, J., Hemmings, B.A. (2005). Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development* 132 (13):2943-54.
- Turrens, J.F. (1997). Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Bioscience Reports* 17, 3-8.
- Uchizono, Y., Takeya, R., Iwase, M., Sasaki, N., Oku, M., Imoto, H., Iida, M., Sumimoto, H. (2006). Expression of isoforms of NADPH oxidase components in rat pancreatic islets. *Life Sci.* 80(2):133-9.
- Um, S.H., Frigerio, F., Watanabe, M., Picard, F., Joaquin, M., Sticker, M., Fumagalli, S., Allegrini, P.R., Kozma, S.C., Auwerx, J., Thomas, G. (2004). Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. SC, Auwerx J, Thomas G. *Nature.* 431(7007):485.
- Valle, M.M., Graciano, M.F., Lopes de Oliveira, E.R., Camporez, J.P., Akamine, E.H., Carvalho, C.R., Curi, R., Carpinelli, A.R. (2011). Alterations of NADPH oxidase activity in rat pancreatic islets induced by a high-fat diet. *Pancreas* 40 (3), 390-5.
- Van Gaal, L.F., Rissanen, A.M., Scheen, A.J., Ziegler, O., Rössner, S.; RIO-Europe Study Group. (2005). Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. *Lancet.* 365 (9468):1389-97.
- Van Sickle, M.D., Duncan, M., Kingsley, P.J., Mouihate, A., Urbani, P., Mackie, K., *et al.* (2005). Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* 310, 329-32.
- Vemuri, V.K., Makriyannis, A. (2015). Medicinal chemistry of cannabinoids. *Clin Pharmacol Ther* 97 (6), 553-8.
- Vilches-Flores, A., Delgado-Buenrostro, N.L., Navarrete-Vázquez, G., Villalobos-Molina, R. (2010). CB1 cannabinoid receptor expression is regulated by glucose and feeding in rat pancreatic islets. *Regul Pept.* 163(1-3):81-7.

- Vieira, E., Salehi, A., Gylfe, E. (2007) Glucose inhibits glucagon secretion by a direct effect on mouse pancreatic alpha cells. *Diabetologia*. 50 (2):370-9.
- Vinogradov, A.D., Grivennikova, V.G. (2015). Oxidation of NADH and ROS production by respiratory complex I. *Biochim Biophys Acta*. 1857 (7):863-71.
- Vives-Pi, M., Rodríguez-Fernández, S., Pujol-Autonell, I. (2015). How apoptotic β -cells direct immune response to tolerance or to autoimmune diabetes: a review. *Apoptosis*. 20 (3):263-72.
- Waldeck-Weiermair, M., Zoratti, C., Osibow, K., Balenga, N., Goessnitzer, E., Waldhoer, M., Malli, R., Graier, W.F. (2008). Integrin clustering enables anandamide-induced Ca^{2+} signaling in endothelial cells via GPR55 by protection against CB1-receptor-triggered repression. *J Cell Sci* 121 (10), 1704-17.
- Wali, J.A., Rondas, D., McKenzie, M.D., Zhao, Y., Elkerbout, L., Fynch, S., Gurzov, E.N., Akira, S., Mathieu, C., Kay, T.W., Overbergh, L., Strasser, A., Thomas, H.E. (2014). The proapoptotic BH3-only proteins Bim and Puma are downstream of endoplasmic reticulum and mitochondrial oxidative stress in pancreatic islets in response to glucotoxicity. *Cell Death Dis*. 5 :e1124.
- Wang, Z., Thurmond, D.C. (2009). Mechanisms of biphasic insulin-granule exocytosis - roles of the cytoskeleton, small GTPases and SNARE proteins. *J Cell Sci* 122 (7), 893-903.
- Wang S., Xu Q., Shu G., Wang L., Gao P., Xi Q., Zhang Y., Jiang Q., Zhu X. (2015). N-Oleoyl glycine, a lipoamino acid, stimulates adipogenesis associated with activation of CB1 receptor and Akt signaling pathway in 3T3-L1 adipocyte. *Biochem Biophys Res Commun* 466 (3), 438-43.
- Watts, M., Fendler, B., Merrins, M.J., Satin, L., Bertram, R., Sherman, A. (2014). Calcium and Metabolic Oscillations in Pancreatic Islets: Who's Driving the Bus? *SIAM J Appl Dyn Syst* 13 (2), 683-703.
- Whyte, L.S., Ryberg, E., Sims, N.A., Ridge, S.A., Mackie, K., Greasley, P.J., Ross, R.A., Rogers, M.J. (2009). The putative cannabinoid receptor GPR55 affects osteoclast function in vitro and bone mass in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 106 (38), 16511-6.
- Wiernsperger, N.F. (2003). Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy. *Diabetes Metab*. 29 (6):579-85.

- Winzell, M.S., Ahrén, B. (2004). The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes* 53 (3), S215-9.
- Woods, S.C., Seeley, R.J., Cota, D. (2008). Regulation of food intake through hypothalamic signaling networks involving mTOR. *Annu Rev Nutr.* 28: 295-311.
- Wu, H.M., Yang, Y.M., Kim, S.G. (2011). Rimonabant, a cannabinoid receptor type 1 inverse agonist, inhibits hepatocyte lipogenesis by activating liver kinase B1 and AMP-activated protein kinase axis downstream of $G\alpha$ i/o inhibition. *Mol Pharmacol* 80 (5), 859-69.
- Wu, C.S., Chen, H., Sun, H., Zhu, J., Jew, C.P., Wager-Miller, J., Straiker, A., Spencer, C., Bradshaw, H., Mackie, K., Lu, H.C. (2013). GPR55, a G-protein coupled receptor for lysophosphatidylinositol, plays a role in motor coordination. *PLoS One* 8 (4), e60314.
- Xu, G., Marshall, C.A., Lin, T.A. *et al.* (1998). Insulin mediates glucose-stimulated phosphorylation of PHAS-1 by pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 273, 4485-4491.
- Xu, X.J., Gauthier, M.S., Hess, D.T., Apovian, C.M., Cacicedo, J.M., Gokce, N., Farb, M., Valentine, R.J., Ruderman, N.B. (2012). Insulin sensitive and resistant obesity in humans: AMPK activity, oxidative stress, and depot-specific changes in gene expression in adipose tissue. *J Lipid Res.* 53 (4):792-801.
- Yaekura, K., Kakei, M., Yada T. (1996). cAMP-signaling pathway acts in selective synergism with glucose or tolbutamide to increase cytosolic Ca^{2+} in rat pancreatic beta-cells. *Diabetes* 45 (3), 295-301.
- Yalow, R.S. (1991). Remembrance project: origins of RIA. *Endocrinology* 129 (4), 1694-5.
- Yamamoto, M., Yamato, E., Toyoda, S., Tashiro, F., Ikegami, H., Yodoi, J., Miyazaki, J. (2008). Transgenic expression of antioxidant protein thioredoxin in pancreatic beta cells prevents progression of type 2 diabetes mellitus. *Antioxid Redox Signal.* 10 (1):43-9.

- Yin, H., Chu, A., Li, W., Wang, B., Shelton, F., Otero, F., Nguyen, D.G., Caldwell, J.S., Chen, Y.A. (2009). Lipid G protein-coupled receptor ligand identification using beta-arrestin PathHunter assay. *J Biol Chem* 284 (18), 12328-38.
- Yuan, T.L., Cantley, L.C. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene*. 27 (41):5497-510.
- Zhang, N., Su, D., Qu, S., Tse, T., Bottino, R., Balamurugan, A.N., Xu, J., Bromberg, J.S., Dong, H.H. (2006). Sirolimus is associated with reduced islet engraftment and impaired beta-cell function. *Diabetes* 55, 2429-2436.
- Zhang, Y., Wei, C., Xi, J., Tang, Z., Liang, C. (2015). Glucose transporter 3 performs a critical role in mTOR-mediated oncogenic glycolysis and tumorigenesis. *Oncol Lett*. 9 (6):2809-2814.
- Zhou, Y., Jetton, T.L., Goshorn, S., Lynch, C.J., She, P. (2010). Transamination is required for α -ketoisocaproate but not leucine to stimulate insulin secretion. *J Biol Chem* 285 (44), 33718-26.
- Zoncu, R., Efeyan, A., Sabatini, D.M. (2011). mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 21-35.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA