

Bases moleculares del efecto del tungstato de sodio sobre la plasticidad pancreática y Tmem27

Jordi Altirriba Gutiérrez

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE MEDICINA

Bases moleculares del efecto del
tungstato de sodio
sobre la plasticidad pancreática

y

Tmem27

A fluorescence microscopy image of a pancreatic islet. The islet is elongated and shows a complex internal structure with numerous small, dark spots. The image is stained with two different dyes: a green dye that highlights the overall structure and a purple dye that appears to be concentrated in specific areas, possibly representing the expression of a particular protein or marker. The background is dark, making the stained islet stand out.

JORDI ALTIRRIBA GUTIÉRREZ

2010



UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE MEDICINA

**BASES MOLECULARES DEL EFECTO DEL
TUNGSTATO DE SODIO SOBRE LA
PLASTICIDAD PANCREÁTICA Y TMEM27**

Tesis doctoral presentada por
Jordi Altirriba Gutiérrez
para optar al título de
Doctor por la Universidad de Barcelona



Esta tesis ha sido realizada bajo la dirección del Dr. Ramon Gomis de Barbarà y del Dr. Albert Barberà Lluís en el laboratorio de Diabetes y Obesidad del IDIBAPS.

Dr. Ramon Gomis de Barbarà

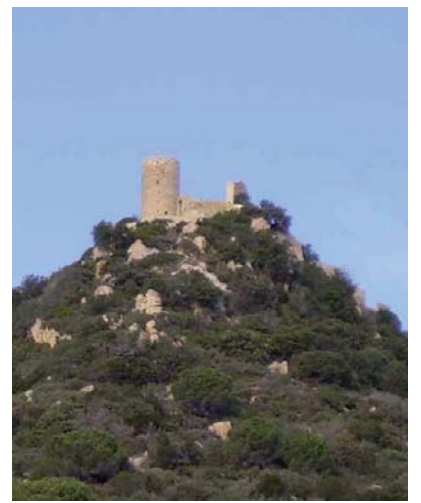
Dr. Albert Barberà Lluís

Jordi Altirriba Gutiérrez

Programa de doctorado de “Medicina”
Facultad de Medicina
Universidad de Barcelona

Barcelona, Junio 2010

A mis padres y a mi hermano,
a Yolanda
por su infinita paciencia, bondad y generosidad.



Burriac

401 m

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Ha llegado el momento de hacer balance de una etapa que ha durado mucho más de lo deseable, pero que al fin ha llegado a buen puerto.

En primer lugar, agradecer a mi director de tesis Ramon Gomis el apoyo recibido y los recursos económicos conseguidos, sin los cuales este proyecto no se hubiera podido llevar a cabo. En segundo lugar a mi segundo director de tesis, Albert Barberà, quien me ha enseñado a ser crítico con los resultados y con el cual he pasado largas noches pescando islotes humanos y escribiendo proyectos europeos.

En cuanto a los compañeros del laboratorio, en un lugar especial, quisiera agradecer la tesis a Núria Palau, compañera de trinchera (como decía Nacho), la cual me enseñó la gran mayoría de técnicas de laboratorio que conozco. Además, hemos pasado muchos momentos juntos de todos los colores, buenos y malos, hemos comido muchos Donuts y hechos muchos cafés y siempre he recibido su apoyo. Por otro lado, agradecer a Núria Marzo los muchos tes y cafés que hemos hecho en las escaleras, comentando la jugada. A Maria Lucas, con la que hemos pasado buenas cenas, amenizadas por un mojito (o dos). A Marta Amigó, por su simpatía y constancia, la vida en el laboratorio contigo fue mucho más divertida y llevadera. A Esther Llagostera, cuya bondad es infinita y sus opiniones científicas siempre son un referente. A Melina Musri, cuya persistencia en el trabajo y hacer la tesis son dignas de admiración. A Nacho Canals, quien soltaba unas puñaladas de armas tomar, pero en el fondo te reías. A la nueva sabia que entró tras de mi, Gemma quien me llamaba Sr Google (pots preguntar, si tinc resposta te la donaré), Miriam Ejarque que ha introducido ese toque de glamour, Fabian Pardo, contigo el laboratorio también es más ameno (y los marcianos nos visitan...) y tienes un gran futuro como científico por delante, Montse que ha progresado enormemente en el laboratorio, Felicia, quien siempre aporta la parte más médica de la investigación, Laura, Joana, Lisa, Alba y Katerina. ¡Desearos suerte a todos!

En cuanto a los investigadores, quisiera agradecerle especialmente a Rosa Gasa las horas que me ha estado escuchando y aconsejándome. Su forma de ser y de trabajar ha sido un referente para mí y lo son para muchos los que estábamos en el laboratorio.

Silvia Casas, quien me ayudó siempre que pudo y cuyas discusiones científicas en la cola del comedor, el bar y en el laboratorio han dado parte de los resultados aquí presentados. Conxi Mora, cuyos horarios comparto, agradecerle que siempre que le he pedido algo lo ha conseguido y en un tiempo récord, a parte de las conversaciones científicas, las cuales espero que acaben fructificando en breve en un artículo. Mamen Carmona, agradecerle las cenas que hemos compartido, que siempre que le he ido a preguntar algo tenía una respuesta y las charlas sobre la cadena mitocondrial y los millones de inhibidores (siempre me hacía un lío). A Silvia Barceló, a la cual siempre que teníamos una duda sobre proteínas acudíamos, lástima que el proyecto que teníamos entre manos no pudiera ser finalizado. A Francesc Felipe (Felip), el cual resolvía cualquier problema que tenía con la informática. A Helena Corominola, que me facilitó el protocolo de extracción de RNA de páncreas total, sin el cual no hubiera podido llevar a cabo el primer proyecto. Al equipo de la France, Maud que tiene un gran porvenir como científica y Sandra cuya bondad también es grande y ¡que hace unos pasteles de muerte! Al equipo hispano-americano-suizo, Nathalie, por las cenas y el tiempo pasado. Al Marc Claret, quien ha confiado en mí en su llegada al laboratorio. A los “nuevos fichajes”, el Joan Marc, Paola y Rebeca y a los no tan nuevos, como Marce y a los que ya no están en el laboratorio, como la Eugènia. A la Ana Novials, quien ahora coordina el grupo y de vez en cuando nos ha de recordar que los resultados deben incorporar una aplicación en humanos. De nuevo, desearos mucha suerte, ¡sois un gran equipo!

Respecto al equipo técnico, quisiera agradecerle especialmente la tesis a Ainhoa García. Siempre le he dicho que es más una investigadora que una técnica. Con ella aprendí muchas cosas del trato con los animales y debo agradecerle que siempre que pudo me prestó su ayuda. A Marta Julià, la “labma”, quien más de una vez ha venido a ayudarme aún a pesar de estar enferma y que tiene el mérito que el laboratorio funcione correctamente en cuanto a facturas y comandas (muchas gracias por tu paciencia con mis comandas, que siempre las escribía tarde). A Sandra Piquer, quien siempre me ha ayudado y tan solo le tenía que explicar lo que necesitaba y ella se encargaba de todo (solo me faltaba pedirle que me escribiera el artículo). A Lidia Sánchez, gran experta en inmunohistoquímica, también siempre que pudo me ayudó,

agradecerle su paciencia conmigo con todos los Adenos que me hizo y su simpatía. A Natalia, “la baronesa”, cuyo glamour y buen humor hacían más llevadero el día a día. A Yaiza Esteban, cuya ayuda me permitió tirar hacia delante el proyecto del Tmem27. A Sílvia Moreno, cuya simpatía hacía la vida más fácil en el laboratorio. A Belén, por sus consejos sobre el tungstato. Gracias a todos, sin vuestro apoyo esta tesis no hubiera sido posible.

Además, durante la tesis he necesitado la ayuda de otros grupos y servicios. Especialmente quiero agradecer la ayuda que siempre me prestó Pedro Jares, quien lleva la plataforma de microarrays de Affymetrix. Siempre que he necesitado algo me lo ha facilitado o me ha resuelto las dudas que tenía. A Roser Casamitjana, del departamento de Hormonal, por que siempre que he tenido alguna duda con alguna técnica que ella manejaba me ha ayudado. A Dolors Colomer, del departamento de Hematopatología, experta en Real Times, de nuevo cualquier cosa que he necesitado me la ha facilitado. A Josep Antoni Bombí, del departamento de Anatomía Patológica, siempre que he necesitado una muestra de páncreas me la ha conseguido. Al grupo de UTR (Unidad de transplante renal), la Maria José, el Jordi y Dani, por facilitarme las células tubulares proximales y ayudarme siempre que lo he necesitado. A Miguel Angel Maestro, del grupo del Ferrer, quien siempre me ha facilitado algún anticuerpo que he necesitado a última hora. A Susana Ros, del grupo del Parc, por su rapidez y eficiencia con los experimentos que teníamos en marcha.

¡Muchas gracias a todos vosotros, la vida en el laboratorio ha sido más fácil con vuestra ayuda!

Al personal auxiliar. Al Xavi, antiguo vigilante de Securitas, con el que me he hecho más de un café a medianoche pasadas. A Pedro, vigilante de Securitas, quien me ha abierto más de una puerta. A Sole, técnica del estabulario, quien me ayudó siempre que pudo.

Por último, y muy especialmente, agradecer esta tesis a mi familia. A mi padre, quien me enseñó la pasión por el conocer. De pequeño siempre le preguntaba el por qué de las cosas y siempre me sorprendía lo mucho que sabía, un día me dijo que de mayor sabría tanto como él. A mi madre, quien me ha enseñado la disciplina de hacer las

cosas, las cuales solo se pueden hacer de una manera, bien. A mi hermano, cuyo trabajo constante es un referente. A mi tío Eugenio, quien siempre me ha apoyado. A mis suegros, cuya extremada bondad y generosidad les agradezco. A mi cuñada, que siempre ha estado allí apoyándome. A mi cuñado, diabético, quien me recuerda más de una vez que detrás de cada experimento que realizamos hay la necesidad de tratar de curar a las personas. Y muy especialmente a Yolanda, quien aguanta con paciencia de una santa mis horarios y siempre me ha apoyado en todas las decisiones que he tomado.

Sin todos vosotros esta tesis no hubiera llegado a su fin. ¡¡MUCHÍSIMAS GRACIAS!!



La Mola

1107 m

ÍNDICE

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	VII
ÍNDICE	XIII
ÍNDICE DE FIGURAS	XXV
ABREVIACIONES	XXXII
<u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.- DIABETES MELLITUS	3
1.1.- Introducción	3
1.2.- Clasificación de la Diabetes	3
1.3.- Prevalencia de la diabetes.....	7
1.4.- Coste en vidas (mortalidad) de la diabetes	7
1.5.- Coste económico de la diabetes	8
2.- PÁNCREAS.....	9
2.1.- Anatomía del Páncreas.....	9
2.1.1.- Páncreas exocrino	9
2.1.2.- Páncreas endocrino	9
2.2.- Crecimiento de los islotes	11
2.2.1.- Mecanismos de homeostasis de la masa de islotes.....	11
2.2.2.- Formación y crecimiento en la etapa de embriogénesis	12
2.2.3.- Crecimiento post-natal.....	12
2.2.4.- Crecimiento en edad adulta	13
2.2.5.- Adaptación de la masa de células beta a la carga metabólica.....	14
2.2.6.- Regeneración del páncreas endocrino en condiciones experimentales	15

2.2.7.- Estado actual	15
2.3.- Seguimiento de la masa de células beta: biomarcadores.....	21
2.4.- Secreción de insulina	23
3.- TUNGSTATO DE SODIO	27
3.1.- Química, etimología e historia	27
3.2.- Bioquímica – Tungstato de sodio como inhibidor de fosfatasas	27
3.3.- Tungstato y diabetes	28
3.4.- Efectos del tungstato sobre el hígado	28
3.5.- Efectos del tungstato sobre el páncreas	31
3.6.- Efectos del tungstato sobre el tejido adiposo.....	33
3.7.- Efectos del tungstato de sodio sobre otros órganos	35
4.- TRANSMEMBRANA 27 (TMEM27).....	39
4.1.- Descripción en el riñón.....	39
4.2.- Descripción en el páncreas.....	41
<u>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u>	43
1.- HIPÓTESIS	45
1.1.- Mecanismos de regeneración del páncreas endocrino	45
1.2.- Papel de Tmem27 en el seguimiento de la masa y proliferación del páncreas endocrino y en la secreción de insulina	45
2.- OBJETIVOS	46
2.1.- Investigar los mecanismos de regeneración pancreática por los cuales actúa el tungstato de sodio en las ratas diabéticas a través de:	46
2.2.- Investigar el papel de Tmem27 en la secreción de insulina, proliferación beta pancreática y su posible uso como marcador de masa beta pancreática:	46

MATERIAL Y MÉTODOS	49
1.- RNA	51
1.1.- Extracción RNA	51
1.1.1.- Preparación de la muestra	51
1.1.2.- Método de purificación por separación en fenol/cloroformo.....	51
1.1.3.- Método de purificación por TRIzol.....	59
1.1.4.- Método de purificación por columnas (RNeasy mini kit)	62
1.2.- Cuantificación del RNA	64
1.3.- determinación de la “pureza” del RNA	64
1.4.- Determinación de la integridad del RNA.....	65
1.4.1.- Electroforesis en gel de agarosa desnaturizante	65
1.4.2.- Electroforesis a través del aparato 2100 Bioanalyzer de Agilent	67
1.5.- Eliminación del DNA en las muestras de RNA.....	68
2.- RETROTRANSCRIPCIONES, CLONACIONES, PCRs	70
2.1.- Retrotranscripción del RNA a cDNA	70
2.2.- Amplificaciones	72
2.2.1.- Amplificaciones convencionales	72
2.2.2.- Amplificaciones a tiempo real.....	73
2.2.3.- Amplificaciones para clonaciones de genes.....	81
2.2.3.1.- Advantage-GC cDNA PCR Kit	81
2.2.3.2.- Expand High Fidelity PCR System	82
2.2.3.- Amplificaciones para secuenciación	83
2.3.- Geles de agarosa	84
2.3.1.- Separación de fragmentos de DNA en agarosa	84
2.3.2.- Purificación de bandas en geles de agarosa	86

3.- VECTORES	88
3.1.- Digestión de vectores	88
3.2.- Desfosforilación de vectores	89
3.3.- Ligación de fragmentos	90
3.4.- Clonación de fragmentos de PCR	91
4.- BACTERIAS	93
4.1.- Transformación de bacterias competentes	93
4.2.- Crecimiento de bacterias en medios líquidos	94
4.3.- Purificación de plásmidos bacterianos.....	95
4.3.1.- Procesamiento de minis	95
4.3.2.- Procesamiento de maxis	97
5.- ADENOVIRUS	100
5.1.- Generación de adenovirus	100
5.2.- Amplificación de adenovirus	102
5.3.- Aislamiento de DNA vírico.....	103
5.4.- Titulación de adenovirus	105
6.- CULTIVOS.....	108
6.1.- Cultivos de líneas celulares	108
6.1.1.- Tripsinización y pasaje.....	108
6.1.2.- Recuento	110
6.1.2.1.- Manual	110
6.1.2.2.- Automático.....	110
6.1.3.- Infección de células	110
6.1.4.- Tratamiento de placas con poli-L-lisina.....	111
6.1.5.- Estudios de proliferación.....	112

6.1.5.1.- Utilización de ^3H -[metil]timidina.....	112
6.1.5.2.- Utilización de BrdU.....	114
6.1.6.- Estudios de secreción de insulina	116
6.1.7.- Estudios de contenido de DNA.....	119
6.1.8.- Estudios de fosforilación	121
6.1.9.- Estudios de secreción de Tmem27.....	122
6.2.- Cultivos primarios: islotes	123
6.2.1.- Cultivo de islotes de rata.....	123
6.2.2.- Infección de islotes.....	124
6.2.3.- Estudios de proliferación.....	125
6.2.4.- Estudios de secreción de insulina	127
6.3.- Cultivos primarios: células tubulares proximales.....	128
6.3.1.- Cultivo de células tubulares proximales.....	129
6.3.2.- Infección de células tubulares proximales	130
7.- ESTUDIOS CON MODELOS ANIMALES.....	130
7.1.- Inducción de diabetes en ratas	130
7.2.- Administración de tungstato.....	131
7.3.- Administración de floricina	132
7.4.- Toma de muestras de sangre	133
7.4.1.- Capilar.....	133
7.4.2.- Total.....	133
7.5.- Test de tolerancia intraperitoneal a la glucosa	134
7.6.- Test de sensibilidad intraperitoneal a la insulina.....	134
7.7.- Aislamiento de islotes de rata	134
8.- INMUNOHISTOQUÍMICA	138

8.1.- Fijación de tejidos.....	138
8.2.- Inmunohistoquímica de tmem27	139
9.- PROTEÍNAS	144
9.1.- Extracción de proteínas.....	144
9.2.- Valoración de proteínas	146
9.3.- Concentración de proteínas	147
9.3.1.- Concentración de proteínas por columnas	147
9.3.2.- Concentración de proteínas por precipitación en acetona	148
9.4.- Estudios de fosforilación	148
9.5.- Estudios de heparinización.....	149
9.6.- Estudios de glicosilación.....	149
9.7.- Electroforesis de proteínas.....	150
9.8.- Transferencia húmeda de proteínas	153
9.9.- Bloqueo de la membrana de PVDF.....	155
9.10.- Inmunodetección de proteínas	155
9.11.- Eliminación de los anticuerpos (stripping)	157
9.12.- Determinación de la concentración de insulina (ELISA)	157
9.13.- Determinación de la concentración de amilasa.....	159
9.14.- Determinación de la cantidad de hemoglobina glicada (HbA1c).....	159
10.- ANÁLISIS BIOINFOMÁTICO: MICROARRAYS DE AFFYMETRIX	160
10.1.- Controles de calidad	160
10.1.1.- Controles establecidos por Affymetrix.....	160
10.1.2.- Otros controles de calidad	162
10.2.- Expresión diferencial	165
10.3.- Clasificación de los genes diferencialmente expresados	166

11.- ESTADÍSTICA	166
RESULTADOS	169
1.- MECANISMOS DE REGENERACIÓN PANCREÁTICA POR LOS CUALES ACTÚA EL TUNGSTATO DE SODIO EN LAS RATAS DIABÉTICAS	171
1.1.- Caracterización fenotípica	171
1.2.- Caracterización morfométrica del páncreas de las ratas de los diferentes grupos experimentales.	173
1.3.- Caracterización de la expresión génica por microarrays	173
1.3.1.- Puesta a punto de la extracción de RNA	175
1.3.2.- Extracción de RNA	176
1.3.3.- Hibridación de los microarrays.....	178
1.3.4.- Controles de calidad de los microarrays	179
1.3.4.1.- Controles de Affymetrix	179
1.3.4.2.- Otros controles de calidad	181
1.3.4.3.- Conclusión de los controles de calidad	185
1.3.5.- Análisis de los microarrays	185
1.3.6.- Selección de los genes a analizar	189
1.4.- Comprobación de los resultados obtenidos a través de los microarrays	190
1.5.- Comprobación de si los cambios observados en la expresión génica son consecuencia de los cambios en la glucemia	191
1.5.1.- Comprobación de la glucemia y hemoglobina glicada en los animales tratados con floricina.....	191
1.5.2.- Determinación de la expresión de los genes de interés	193
1.6.- Efectos sobre la proliferación de la célula beta	194

1.7.- Implicación de la vía de las MAPK en la proliferación de los islotes inducida por tungstato	195
2. PAPEL DE TMEM27 EN LA SECRECIÓN DE INSULINA, PROLIFERACIÓN BETA PANCREÁTICA Y POSIBLE USO COMO MARCADOR DE MASA BETA PANCREÁTICA..	198
2.1.- Expresión de Tmem27 en los islotes de las ratas sanas tratadas y no tratadas con tungstato de sodio	198
2.2.- Caracterización de la secreción de insulina estimulada por glucosa en los islotes de los animales sanos tratados con tungstato de sodio	199
2.3.- Caracterización fenotípica de las ratas sanas tratadas con tungstato de sodio	199
2.4.- Expresión de insulina en los islotes de las ratas sanas tratadas y no tratadas con tungstato de sodio y correlación con Tmem27	200
2.5.- Localización de TMEM27	201
2.6.- Expresión de TMEM27 en islotes de páncreas humanos provenientes de donantes sin y con diabetes	203
2.7.- Localización de TMEM27 en páncreas humanos provenientes de donantes sin y con diabetes	204
2.8.- Correlación entre la expresión de Tmem27 y la expresión de genes implicados en la secreción de insulina o en la progresión del ciclo celular en islotes humanos	205
2.9.- Estudios de sobreexpresión de Tmem27	206
2.9.1.- Patrón de Tmem27 en diferentes especies	207
2.9.2.- Efectos de la sobreexpresión de Tmem27 en células INS-1 832/13	209
2.9.3.- Efectos de la sobreexpresión de Tmem27 en cultivos primarios de islotes	211
2.10.- Uso potencial de Tmem27 como marcador de masa de células beta	211
2.10.1.- Caracterización de las bandas observadas por Western Blot correspondientes a Tmem27	213

2.10.2.- Observación de la escisión de Tmem27 por células beta pancreáticas y células tubulares proximales renales	215
<u>DISCUSIÓN</u>	217
1.- MECANISMOS DE REGENERACIÓN PANCREÁTICA POR LOS CUALES ACTÚA EL TUNGSTATO DE SODIO EN LAS RATAS DIABÉTICAS	217
2.- PAPEL DE TMEM27 EN EL PÁNCREAS ENDOCRINO Y USO POTENCIAL COMO MARCADOR DE MASA DE CÉLULAS BETA.....	226
<u>CONCLUSIONES</u>	231
1.- MECANISMOS DE REGENERACIÓN PANCREÁTICA POR LOS CUALES ACTÚA EL TUNGSTATO DE SODIO EN LAS RATAS DIABÉTICAS	233
2.- PAPEL DE TMEM27 EN EL PÁNCREAS ENDOCRINO Y USO POTENCIAL COMO MARCADOR DE MASA DE CÉLULAS BETA.....	233
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	235
<u>ARTÍCULOS</u>	247
Molecular mechanisms of tungstate-induced pancreatic plasticity: a transcriptomics approach (BMC Genomics 2009, 10:406)	249
The role of transmembrane protein27 (TMEM27) in islet physiology and its potential use as a beta cell mass biomarker (Diabetologia. 2010 ;53(7):1406-14)	290



Montserrat

1236 m

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1	Diferente distribución de tipos celulares en islotes de diferentes especies....	11
Fig. 2	Esquema de los mecanismos de homeostasis de islotes y células beta	12
Fig. 3	Esquema de los constructos que portan los animales	16
Fig. 4	Posibles resultados del experimento de Dor y colaboradores	18
Fig. 5	Esquema de la secreción de insulina por la célula beta	24
Fig. 6	Perfil de secreción de insulina inducida por glucosa en islotes aislados	25
Fig. 7	Proceso de secreción de un gránulo de insulina y principales moléculas implicadas del complejo SNARE	26
Fig. 8	Vía sobre la que actúa el tungstato de sodio en células CHO-R.....	30
Fig. 9	Resumen de los órganos y efectos del tungstato en diferentes modelos animales	38
Fig. 10	Homologías entre ACE, ACE2 y Tmem27.....	39
Fig. 11	Representación esquemática de las modificaciones post-traduccionales y los diferentes dominios de Tmem27	40
Fig. 12	RNA electroeluido en un gel de agarosa desnaturizante	67
Fig. 13	Electroferograma de una muestra de islotes de rata.....	68
Fig. 14	Ejemplo de amplificación del gen de la CDK6 en islotes humanos	74
Fig. 15	Ejemplo de curva estándar para PCR a tiempo real.....	75
Fig. 16	Ejemplos de curvas de disociación	77
Fig. 17	Representación esquemática de cómo distribuir las diferentes diluciones de adenovirus en una placa de 96 pocillos.....	107
Fig. 18	Esquema de montaje de un casete de transferencia	153
Fig. 19	Seguimiento de la glucemia en los grupos experimentales examinados	172
Fig. 20	Valores de insulinemia (A) y de amilasemia (B) en ratas sanas y diabéticas tratadas y no tratadas con tungstato de sodio al final del tratamiento	172
Fig. 21	Características morfométricas de los páncreas de las ratas sanas y diabéticas tratadas y no tratadas con tungstato de sodio	174
Fig. 22	Muestras de RNA de páncreas total electroeluidas en un gel de agarosa desnaturizante	176
Fig. 23	Perfil de RNA (electroferogramas) de las muestras seleccionadas para	

hibridar los arrays de cada grupo obtenidos por el 2100 Bioanalyzer.....	177
Fig. 24 Esquema experimental del experimento realizado con microarrays para la observación de la expresión génica de cada grupo experimental	178
Fig. 25 Visualización del microarray DT1 tras ser escaneado.	179
Fig. 26 Detalle del microarray DT1.....	180
Fig. 27 Representación gráfica de todos los valores de todas las sondas del microarray para cada microarray	181
Fig. 28 Valores medios de todas las sondas situadas en la misma posición dentro de la probeset.....	182
Fig. 29 Representación gráfica de los valores de todas las probesets tras aplicar el algoritmo RMA.....	182
Fig. 30 Representación gráfica de los pseudo-chips obtenidos para cada microarray.	183
Fig. 31 Diagramas de cajas RLE para cada microarray	184
Fig. 32 Diagramas de cajas NUSE para cada microarray.....	185
Fig. 33 Heatdiagram de los genes diferencialmente expresados en los diferentes microarrays.....	187
Fig. 34 Diagrama circular con los genes expresados diferencialmente en el grupo de diabetes	188
Fig. 35 Diagrama circular con los genes expresados diferencialmente en el grupo de los animales diabéticos tratados con tungstato	188
Fig. 36 Determinación de la expresión de Tgfb3, Fgf13, Xbp1, Usag1, Tspan8, Sel1h, Rkip, Insulina 2 y Amilasa de los páncreas totales de los animales sanos no tratados (SNT), sanos tratados (ST), diabéticos no tratados (DNT) y diabéticos tratados (DT).....	191
Fig. 37 Glucemia de los animales diabéticos por estreptozotocina tratados y no tratados con floricina.....	192
Fig. 38 Hemoglobina glicada (HbA1c) de los animales tratados y no tratados con floricina	192
Fig. 39 Determinación de la expresión de Nupr1, Tgfb3, Fgf13, Xbp1, Usag1, Tspan8, Sel1h, Rkip, Insulina 2 y Amilasa de los páncreas totales de los animales diabéticos no tratados y tratados con floricina.....	193

Fig. 40 Estudios de proliferación de las células INS-1-E cultivadas en presencia de tungstato de sodio (A) o suero de los diferentes grupos experimentales (B) .	195
Fig. 41 Estudios de la fosforilación de p42/p44 en las células INS-1-E cultivadas en presencia de tungstato de sodio (A, D) o suero de los diferentes grupos experimentales (B-C, E-F)	197
Fig. 42 Los islotes de las ratas sanas tratadas con tungstato de sodio expresan en menor cantidad Tmem27	198
Fig. 43 Secreción estática de insulina en islotes aislados de animales SNT y ST	199
Fig. 44 Test de tolerancia intraperitoneal a la glucosa y de sensibilidad a la insulina	200
Fig. 45 Los islotes de las ratas sanas tratadas con tungstato de sodio expresan en menor cantidad insulina y presentan una correlación significativa entre Tmem27 e insulina	201
Fig. 46 TMEM27 se expresa principalmente en las células beta en el páncreas humano.....	202
Fig. 47 TMEM27 se expresa principalmente en las células proximales tubulares en el riñón humano	203
Fig. 48 TMEM27 se haya disminuido en islotes de donantes con diabetes de tipo 2 .	203
Fig. 49 TMEM27 se expresa principalmente en las células beta en el páncreas humano sin y con diabetes de tipo 2	204
Fig. 50 La expresión de TMEM27 correlaciona con INSULINA y ESNAPINA, pero no con genes implicados en la progresión del ciclo celular en islotes humanos..	205
Fig. 51 La expresión de ESNAPINA correlaciona con INSULINA en islotes humanos...	206
Fig. 52 Tmem27 presenta una elevada homología entre las especies estudiadas.....	207
Fig. 53. La localización pancreática de Tmem27 en rata, ratón y humano se restringe a las células beta	208
Fig. 54 Tmem27 de rata, ratón y humano presenta diferente peso molecular por Western Blot.....	209
Fig. 55 Tmem27 de rata, ratón y humano ejercen efectos similares sobre las células INS-1 832/13.....	210
Fig. 56 La sobreexpresión de Tmem27 en islotes de rata incrementa la secreción de insulina inducida por glucosa sin afectar la proliferación	211
Fig. 57 Esquema de la proteína Tmem27.....	212

Fig. 58 Modificaciones post-traduccionales de Tmem27 en INS-1 832/13 214

Fig. 59 Expresión de Tmem27 a diferentes horas tras la infección de INS-1 832/13 con
Ad-Tmem27 214

Fig. 60 La rotura de Tmem27 no es exclusiva de células beta, observación de los
extractos celulares..... 215

Fig. 61 La rotura de Tmem27 no es exclusiva de células beta, observación del
sobrenadante..... 216

Fig. 62 El fragmento de Tmem27 liberado al sobrenadante se desglucosila 216

Fig. 63 Vías que intervienen en los efectos del tungstato de sodio sobre el páncreas
diabético 224



Punta dels Pins Carrassers

1059 m

ABREVIACIONES

ABREVIACIONES

7-AAD	7-amino-actinomicina D
ACC	acetil-CoA carboxilasa
ACE2	<i>angiotensin converter enzyme</i> enzima convertidor de angiotensina 2
acetil-CoA	acetil-coenzimaA
Agrp	<i>Agouti related protein</i> proteína relacionada con Agouti
ALT	alanina aminotransferasa
AMPc	adenosil monofosfato cíclico
aP2	factor de transcripción AP-2
AST	aspartato aminotransferasa
ATP	adenosil trifosfato
B ⁰ AT1	<i>system B0 neutral amino acid transporter</i> transportador de aminoácidos neutros del sistema B0
BrdU	bromodeoxiuridina
BSA	<i>bovine serum albumine</i> albúmina de suero bovino
Cart	<i>cocaine and amphetamine responsive transcript</i> transcrito que responde a cocaína y anfetamina
CDK2	<i>cyclin dependent kinase 2</i> ciclina dependiente de quinasa 2
CDK6	<i>cyclin dependent kinase 6</i> ciclina dependiente de quinasa 6
C/EBP α	<i>CCAAT enhancer-binding protein</i> proteína potenciadora de unión a CCAAT
C/EBP β isoforma LIP	<i>C/EBPβ isoforma liver-enriched inhibitory protein</i> C/EBP β isoforma inhibitoria enriquecida en el hígado
CHOIR	<i>Chinese hamster ovary with insulin receptor</i> células de ovario de hamster Chino que sobreexpresan el receptor de insulina humano
CIAP	<i>calf intestinal alkaline phosphatase</i> fosfatasa alcalina de intestino de becerro
CK	<i>creatinin kinase</i> quinasa de creatinina
cpm	cuentas por minuto
c.s.p.	cantidad suficiente para
Ct	<i>cycle threshold</i> ciclo lindar
DEPC	dietil pirocarbonato
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i> medio de aguilá modificado por Dulbecco

DMSO	dimetilsulfóxido
DNasal	deoxyribonucleasa I
DNT	ratas diabéticas no tratadas
dNTP	deoxinucleótidos trifosfatos
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i> solución salina tamponada de fosfatos de Dulbecco
DT	ratas diabéticas tratadas
DTBZ	dihidrotetrabenazina
DTT	ditiotreitól
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i> quimioluminiscencia aumentada
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
Erk1/2	<i>extracellular signal-regulated kinase 1/2</i> quinasa de regulación de señales extracelulares 1/2
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i> separación de células activadas por fluorescencia
FADH ₂	flavina adenina dinucleótido dihidrogenado
FAS	<i>fatty acid synthase</i> sintasa de ácidos grasos
FBPasa	fructosa-1,6-bisfosfatasa 2
FBS	<i>fetal bovine serum</i> suero bovino fetal
<i>Fgf13</i>	<i>fibroblast growth factor 13</i> factor de crecimiento de fibroblastos 13
FSH	<i>follicle-stimulating hormone</i> hormona folículo estimulante
GAD	<i>glutamic acid decarboxylase</i> descarboxilasa del ácido glutámico
GLP-1	<i>glucagon-like peptide-1</i> péptido similar al glucagon-1
Glut-2	<i>glucose transporter 2</i> transportador de glucosa 2
Glut-3	<i>glucose transporter 3</i> transportador de glucosa 3
Gsk-3 β	<i>glycogen synthase kinase 3 β</i> quinasa de la sintasa de glicógeno 3 β
GTP	guanosina trifosfato
HbA1c	hemoglobina glicada
HBBS	<i>Hank's balanced salt solution</i> solución equilibrada de sales de Hank

HEK-293	<i>human epithelial kidney-293</i> células epiteliales de riñón humano-293
HEPES Na	4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfonato sódico
<i>HNF-1α</i>	<i>hepatocyte nuclear factor 1α</i> factor nuclear de hepatocitos 1 α
<i>HNF-1β</i>	<i>hepatocyte nuclear factor 1β</i> factor nuclear de hepatocitos 1 β
<i>HNF-4α</i>	<i>hepatocyte nuclear factor 4α</i> factor nuclear de hepatocitos 4 α
HPAP	<i>human placental alkaline phosphatase</i> fosfatasa alcalina humana de placenta
H-Ras	<i>Harvey rat sarcoma virus oncogene 1</i> oncogen 1 del virus del sarcoma de rata Harvey
HRP	<i>horsperadish peroxidase</i> peroxidasa de rábano picante
<i>Ib-2</i>	<i>islet-brain 2</i> islote-cerebro 2
IgM	inmunoglobulina de tipo M
<i>IPF-1</i>	<i>insulin promoter factor-1</i> promotor de insulina factor-1
IPTG	isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido
Km	constante de Michaelis
KO	<i>knock-out</i> Genoanulado
K-Ras	<i>v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i> homólogo del oncogen viral del sarcoma de rata v-Ki-ras2 Kirsten
LB agar	<i>lysogeny broth agar</i> caldo de lisogénie con agar
L-DOPA	<i>(S)-2-amino-3-(3,4-dihydroxyphenil) propanoic acid</i> (S)-2-amino-3-(3,4-dihidroxifenil) ácido propanoico
LH	<i>luteinizing hormona</i> hormona luteinizante
L-PK	<i>liver pyruvate kinase</i> piruvato quinasa hepática
LPL	Lipoproteinlipasa
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i> proteína quinasa activada por mitógenos
MAS5.0	<i>MicroArray Suite 5.0</i>
mCPT1	mitochondrial carnitinapalmitoiltransferasa 1
MEF2	<i>myocyte enhancer factor 2</i> factor de potenciación de miocitos 2
Mek1/2	<i>MAPK/ Erk kinase 1/2</i> quinasa de MAPK/ Erk ½

MM	<i>mismatch</i> sonda con secuencia no coincidente
MODY	<i>maturity-onset diabetes of the young</i> diabetes de comportamiento del adulto que se presenta en el joven
moi	<i>multiplicity of infection</i> multiplicidad de infección
MOPS	tampón del ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
NADHs	nicotinamida adenina dinucleótido hidrogenado
NEFA	<i>non esterified fatty acid</i> ácidos grasos no esterificados
<i>ngn3</i>	neurogenina3
Npy	neuropéptido Y
N-Ras	<i>neuroblastoma ras oncogene</i> oncogen ras de neuroblastoma
nSTZ	<i>neonatal streptozotocin treated rats</i> ratas neonatales tratadas con estreptozotocina
<i>Nupr1</i>	<i>nuclear protein 1</i> proteína nuclear 1
NUSE	<i>normalized unscaled standard errors</i> errores estándar normalizados sin escalar
p90rsk	<i>90 kDa ribosomal S6 kinases</i> proteína quinasa de la proteína ribosomal S6 de 90 kDa
PAP2	<i>phosphatidic acid phosphatase type 2</i> fosfatasa del ácido fosfatídico tipo 2
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> tampón salino de fosfatos
PCI	<i>phenol:chloroform:isoamyl alcohol</i> fenol:cloroformo:isoamil alcohol
pCMV	promotor de citomegalovirus
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> reacción en cadena de la polimerasa
pdx-1	pancreático y duodenal homeobox 1
PEPCK	<i>phosphoenolpyruvate carboxykinase</i> fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
PET	<i>positron emission tomography</i> tomografía por emisión de positrones
PFU	<i>plate forming units</i> unidades formadoras de clapas
PI3K	<i>phosphoinositol-3-kinase</i> fosfoinositol-3-quinasa
PLIER	<i>probe logarithmic intensity error</i> error logarítmico de la intensidad de las sondas

PM	<i>perfectmatch</i> sonda con secuencia coincidente
PP	polipéptido pancreático
PPAR γ	<i>peroxisome proliferator-activated receptor γ</i> receptor de peroxisoma activado por proliferación γ
PTPase	<i>protein tyrosine phosphatase</i> tirosina fosfatasa de proteínas
PVDF	<i>polyvinylidene fluoride</i> fluoruro de polivinilideno
Raf	<i>v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1</i> homólogo del oncogen viral de la leucemia murina v-raf-1
rBAT	<i>cystine, dibasic and neutral amino acid transporters</i> transportador de aminoácidos neutros, dibásicos y cisteína
RIP	<i>rat insulin promoter</i> promotor de la insulina de rata
<i>Rkip</i>	<i>raf kinase inhibitor protein</i> proteína inhibidora de la quinasa Raf
RLE	<i>relative log expresión</i> expresión relativa logarítmica
RMA	<i>robust multi-chip average</i> media robusta de múltiples microarrays
RMN	resonancia magnética nuclear
RNAr	RNA ribosómico
RNasas	Ribonucleasas
RPMI 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute 1640</i>
RRP	<i>ready releasable pool</i> preparado para su liberación
SDS	<i>sodium dodecil sulfate</i> dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SDSv2.3	<i>sequence detection system version 2.3</i> sistema de detección de secuencias versión 2.3
<i>Sel1h</i>	<i>suppressor of lin-12-like</i> similar al supresor de lin-12
SEM	<i>standard error mean</i> media del error estándar
Sglt1	<i>sodium/Glucosa transporter 1</i> transportador de sodio y glucosa 1
siRNA	<i>small interference RNA</i> ARN pequeño de interferencia
Snap-25	<i>synaptosome-associated protein of 25 kDa</i> proteína asociada a sinaptosoma de 25 kDa

Solución de TE	solución de Tris y EDTA
Solución de TENS	solución de Tris, EDTA, NaOH y SDS
SPECT	<i>single photon emission computed tomography</i> tomografía computerizada de emisiones de un fotón
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor</i> receptor del factor de unión soluble sensible a N-etilmaleimida
SNT	ratas sanas sin tratar
ST	ratas sanas tratadas
TAE	tris, acético y EDTA
<i>Tbp</i>	<i>TATA box binding protein</i> proteína de unión a la caja TATA
TBS	<i>tris buffered saline</i> tampón salino de tris
TBS-T	<i>tris buffered saline-tween</i> tampón salino de tris con tween
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
<i>Tgfb3</i>	<i>transforming growth factor, beta 3</i> factor de crecimiento de transformación beta 3
TMB	Tetrametilbenzidina
Tmem27	transmembrana 27
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
<i>Tspan8</i>	tetraspanina 8
UCP1	<i>uncoupling protein 1</i> proteína desacopladora 1
UPR	<i>unfolding protein response</i> respuesta a proteínas mal plegadas
<i>Usag-1</i>	<i>uterine sensitization-associated gene-1</i> gen asociado a la sensibilización uterina 1
Vamp-2	<i>vesicle-associated membrana protein 2</i> proteína de membrana asociada a vesículas 2
VMAT-2	<i>vesicular monoamine transporter type 2</i> transportador vesicular de monoaminas de tipo 2
WT	<i>wild type</i> cepa salvaje
<i>Xbp1</i>	<i>X-box binding protein 1</i> proteína de unión a la caja X 1
XT2	<i>X transporter protein 2</i> proteína transportadora X 2
XT3s1/SIT1	<i>X transporter protein 3 similar 1</i> proteína similar 1 a la proteína transportadora X 3
ZDF	<i>Zucker diabetic fatty</i> ratas Zucker diabéticas y obesas



Turó de l'Home i les Agudes

1706 m y 1706 m

INTRODUCCIÓN

1.- DIABETES MELLITUS

1.1.- Introducción^[1]

La diabetes según la Asociación Americana de Diabetes es una enfermedad metabólica caracterizada por presentar hiperglucemia como causa de un déficit en la secreción y/o acción de la insulina.

El origen y desarrollo de la diabetes es debida a múltiples causas, que van desde la destrucción autoinmune de las células beta pancreáticas productoras de insulina con el consiguiente déficit de insulina, hasta anormalidades en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas debido a una secreción insuficiente de insulina y/o a una respuesta disminuida a la insulina en sus tejidos diana (músculos, tejido adiposo, hígado, etc.).

Los principales síntomas de la diabetes son la aparición de poliuria, polidipsia, polifagia, pérdida de peso y visión borrosa.

Las consecuencias a largo término de la diabetes incluyen retinopatía con potencial pérdida de visión, nefropatía que puede dar lugar a fallo renal, neuropatía periférica que puede desembocar en úlceras, amputaciones de los pies y enfermedad neuropática articular (articulación de Charcot), neuropatía autonómica que causa disfunción gastrointestinal, genitourinaria, cardiovascular y sexual. Por último, también aparecen de forma frecuente hipertensión y anormalidades en el metabolismo de las lipoproteínas.

1.2.- Clasificación de la diabetes^[1]

Según el último informe de la Asociación de Americana de Diabetes, la diabetes se clasifica en:

I.- Diabetes Tipo I

1.- Autoinmune

Esta forma de diabetes supone el 5-10% de los casos de diabetes. Esta enfermedad, que anteriormente recibía el nombre de diabetes insulino-dependiente o diabetes

juvenil, es debida a una destrucción autoinmune de las células beta pancreáticas, responsables de la producción de insulina. La destrucción autoinmune de la célula beta se ha relacionado con múltiples factores genéticos y medioambientales.

2.- Idiopática

Algunas formas de diabetes de tipo I tienen origen desconocido, presentando algunos de estos pacientes déficit de insulina, pero sin ninguna evidencia de autoinmunidad.

II.- Diabetes Tipo II

Esta forma de diabetes supone el 90-95% de los casos de diabetes. Esta enfermedad, que anteriormente recibía el nombre de diabetes no insulino-dependiente o diabetes del adulto, aparece en individuos que presentan resistencia al efecto de la insulina y una relativa deficiencia de insulina, siendo la mayoría de estos pacientes obesos.

La hiperglucemia que da lugar este tipo de diabetes se suele desarrollar gradualmente durante varios años, de forma que en los estadios iniciales de la enfermedad, el paciente no es diagnosticado, debido a que no presenta ninguno de los síntomas clásicos de la diabetes. Además, estos pacientes presentan una secreción de insulina deficiente e insuficiente para contrarrestar la resistencia a la insulina que aparece en los órganos sobre los que actúa la insulina.

El riesgo de desarrollar esta forma de diabetes se incrementa con la edad, la obesidad y la falta de ejercicio físico. Además, se da con una mayor incidencia en mujeres que han sufrido previamente diabetes gestacional y en individuos con hipertensión o dislipemia. También se la asocia con una fuerte predisposición genética (mayor que la diabetes de tipo I autoinmune).

III.- Otros tipos específicos de diabetes

1.- Defectos genéticos de la célula beta

Varias formas de diabetes están asociadas a defectos monogénicos, con herencia autosómica dominante, de la función de la célula beta y reciben el nombre de MODY (*maturity-onset diabetes of the young*, que vendría a ser diabetes de comportamiento del adulto que se presenta en el joven).

Estas formas de diabetes se caracterizan frecuentemente por la aparición de hiperglucemia en una edad temprana (generalmente antes de los 25 años), secreción de insulina defectuosa y no aparición de anticuerpos propios de la diabetes tipo I.

Los principales genes alterados son *HNF-1α* (hepatocyte nuclear factor 1α [factor nuclear de hepatocitos 1 α], causa MODY3, siendo el MODY más frecuente), glucoquinasa (MODY2), *HNF-4α* (MODY1), *IPF-1* (insulin promoter factor-1 [Promotor de insulina factor-1], causa MODY4), *HNF-1β* (causa MODY5), NeuroD1 (MODY6). Además se dan casos de alteraciones del DNA mitocondrial, del gen de la insulina y de los mecanismos de maduración de la insulina.

2.- Defectos genéticos de la acción de la insulina

Hay casos raros de diabetes en que se ve afectado el receptor de la insulina o moléculas de señalización de la insulina, entre ellos encontramos la resistencia a la insulina tipo A, Leprechaunismo o síndrome Donohue, síndrome Rabson-Mendenhall, diabetes lipoatrófica, etc.

3.- Enfermedades del páncreas exocrino

Cualquier proceso que produzca un daño extendido en el páncreas puede causar diabetes, debido a que el número de células beta se ve reducido. Entre estas enfermedades encontramos la pancreatitis, neoplasia, fibrosis quística, hemocromatosis, litiasis pancreática, etc.

4.- Endocrinopatías

Varias hormonas, como la hormona del crecimiento, el cortisol, el glucagón, la epinefrina antagonizan el efecto de la insulina, con lo que enfermedades que transcurran con una elevación de estas hormonas causan diabetes, como son la acromegalia, el síndrome de Cushing, el glucagonoma, el hipertiroidismo, el somatostatina, el aldosteronoma, etc. Generalmente al eliminarse el exceso de hormonas (por resección del tumor, por ejemplo), se observa una normalización de la glucemia.

5.- Inducida por fármacos o tóxicos

Algunos fármacos pueden dar lugar a una reducción en la secreción de insulina, de forma que podrían inducir la diabetes a individuos con resistencia a la insulina. Algunos de estos fármacos son pentamidina, ácido nicotínico, glucocorticoides, hormona tiroidea, diazóxido, agonistas β -adrenérgicos, tiazidas, fenitoina, interferón α , etc.

Algunos tóxicos, como el raticida Vacor, pueden provocar una destrucción de las células beta pancreáticas

6.- Infecciones

Algunos virus como el de la rubéola, coxsackie B, citomegalovirus, adenovirus y paramixovirus han sido descritos como inductores en ciertos casos de diabetes.

7.- Formas poco comunes de diabetes mediada por el sistema inmunitario

Aproximadamente un tercio de los pacientes con el síndrome de Stiff-man (enfermedad autoinmune del sistema nervioso central que presenta anticuerpos contra la descarboxilasa del ácido glutámico, GAD) desarrollan diabetes.

8.- Otros síndromes genéticos asociados a veces con diabetes

Algunos síndrome genéticos van acompañados por un aumento de la incidencia de la diabetes, como son el síndrome de Down, en síndrome de Klinefelter, el síndrome de Turner, el síndrome de Wólfram, la ataxia de Friedreich, el síndrome de Huntington, el síndrome de Lawrence-Moon-Bield, la distrofia miotónica, la porfiria, el síndrome de Prader-Willi, etc.

9.- Diabetes gestacional

Esta enfermedad se define como cualquier grado de intolerancia a la glucosa con aparición o primera detección durante el período gestacional.

1.3.- Prevalencia de la diabetes ^[5]

Datos de población entre 20-79 años con diabetes:

	2007	2025
Prevalencia	6,0 %	7,3%
Número de personas afectadas	246 millones	380 millones

Datos de población entre 0-14 años con diabetes:

	2007
Prevalencia	0,02 %
Número de personas afectadas	444.000

1.4.- Coste en vidas (mortalidad) de la diabetes ^[5]

Por regiones, la mortalidad atribuible a la diabetes se desglosa de la siguiente manera:

Región	Hombres	Mujeres	Total	Porcentaje de muertes atribuibles a la diabetes
África	133.055	204.322	337.377	5,4
Oriente próximo y Mediterráneo Este	115.933	181.531	297.464	11,5
Europa	329.423	391.873	721.296	11,1
Norte América	122.505	119.129	241.634	11,8
Sur y Centro América	90.461	98.192	188.653	9,4
Sur Este Asiático	430.109	587.100	1.017.209	12,1
Oeste Pacífico	544.719	432.918	977.637	8,6
Total	1.766.205	2.015.065	3.781.270	9,6

1.5.- Coste económico de la diabetes^[5]

En el año 2007 se estimó que el coste que supone la diabetes a nivel mundial es de unos 232.000 millones de dólares americanos.

Por regiones, los gastos se desglosan de la siguiente forma:

Región	Gasto en millones de dólares americanos
África	710
Oriente próximo y Mediterráneo Este	3.196
Europa	63.987
Norte América	128.692
Sur y Centro América	4.503
Sur Este Asiático	2.068
Oeste Pacífico	28.811
Total	231.968

CIFRAS PARA RECORDAR

- El 90-95% de las personas diabéticas padecen diabetes tipo II.
- En la edad entre 20 y 79 años la prevalencia mundial de diabetes es del 6%, afectando a 246 millones de personas.
- La mortalidad mundial atribuible a la diabetes es de unos 3.8 millones de personas, representando el 9,6% de las muertes.
- El coste estimado mundial es de 232.000 millones de dólares.

2.- PÁNCREAS

2.1.- Anatomía del Páncreas^[6]

El páncreas tiene dos componentes principales: el páncreas exocrino, que produce los enzimas digestivos que van a parar al duodeno a través de unos ductos que desembocan en el colédoco; y el páncreas endocrino, que se encuentra difuminado en el páncreas y cuya función es la de secretar hormonas al torrente sanguíneo.

Un páncreas humano pesa entre 40 y 150 g y el páncreas endocrino, formado por los islotes de Langerhans, suponen entre el 2 y el 5% del páncreas.

Anatómicamente en el páncreas se distinguen tres partes: cabeza que permanece adyacente al duodeno, la cola que permanece adyacente al bazo y el cuerpo que es la parte central. A pesar de la descripción de las diferentes partes del páncreas, éste es un tejido bastante homogéneo con pocas diferencias entre las diferentes partes.

2.1.1.- Páncreas exocrino^[7]

Está formado principalmente por células acinares de forma piramidal, que se agrupan formando acinos con una forma similar a una bolsa. Los acinos liberan los enzimas digestivos (amilasa, proteasas, nucleasas, lipasas, etc.) en forma inactiva a los ductos y cuando llegan al duodeno se produce su activación por proteólisis.

2.1.2.- Páncreas endocrino^[7]

Las agrupaciones de células endocrinas reciben el nombre de islotes y fueron descritas por primera vez por Paul Langerhans (1869), por lo que actualmente se llaman islotes de Langerhans. Von Mering y Minkowski [8] descubrieron la relación entre el páncreas y el control del metabolismo de la glucosa, tras extraerle el páncreas a un perro y observar que presentaba los síntomas clásicos de diabetes.

Los islotes se encuentran rodeados por tejido exocrino y se ha calculado que un páncreas humano posee alrededor de 1.000.000 de islotes. La forma de los islotes y la distribución de los diferentes tipos celulares varían entre especies, siendo los de los roedores principalmente esféricos, mientras que en humanos son menos regulares y

varían de tamaño entre 50 y 500 μ m de diámetro. La distribución de los islotes en el páncreas humano adulto es heterogénea, siguiendo el siguiente patrón de la cabeza a la cola: mientras que en la cabeza los islotes son más pequeños y están en mayor densidad, en la cola los islotes están en menor cantidad pero son más grandes [9].

Los islotes pancreáticos se componen de 5 tipos celulares, según la hormona que produzcan: células productoras de insulina (células β), células productoras de glucagón (células α), células productoras de somatostatina (células δ), células productoras de polipéptido pancreático (células PP) y células productoras de ghrelina (células ϵ). Además, a parte de las células productoras de hormonas, los islotes también contienen fibroblastos que dan soporte y forman una membrana que encapsula el islote, pericitos que soportan los capilares, vasos sanguíneos, que irrigan los islotes y a donde van a parar las hormonas que se producen y fibras nerviosas, que envían señales provenientes del sistema nervioso central.

Entre especies, la distribución celular de los islotes es diferente (Fig. 1). Mientras que en roedores (con la excepción de la cepa de ratones Balb/C [10]), las células β se encuentran en el centro de los islotes rodeadas de otras células productoras de hormonas, en humanos la distribución de los tipos celulares es más heterogénea, no existiendo claramente un núcleo de células β .

La composición de los islotes en el caso de los humanos es de aproximadamente un 70% de células β , un 20% de células α , menos de un 10% de células δ y menos de un 5% de células PP y ϵ [11]. Además, la composición de los islotes varía según la región del páncreas, siendo la parte posterior de la cabeza del páncreas una zona donde los islotes presentan un elevado contenido de células PP [12].

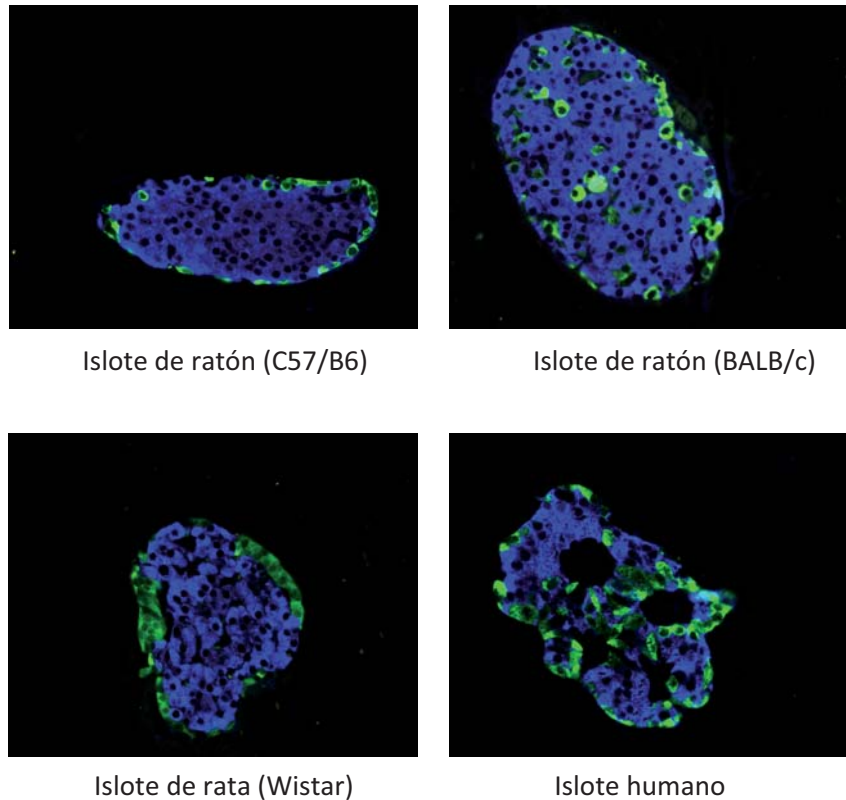


Fig. 1.- Diferente distribución de tipos celulares en islotes de diferentes especies. Insulina en azul y glucagón en verde. Fotos adquiridas en el laboratorio a 40x.

2.2.- Crecimiento de los islotes

2.2.1.- Mecanismos de homeostasis de la masa de islotes

La literatura está repleta de estudios sugiriendo mecanismos de plasticidad de islotes y células beta (Fig. 2). Estudios iniciales, basándose en la incorporación de timidina tritiada indicaron que los islotes pancreáticos pertenecían a una clase de tejidos que eran mantenidos básicamente por replicación de células diferenciadas [13, 14]. Más recientemente, trabajos basados en estudios inmunohistoquímicos sugieren la presencia de *stem-cells* o células progenitoras, que darían lugar a los islotes. Estas células progenitoras residirían en el epitelio pancreático ductal (proceso de neogénesis) [15-17], dentro de los islotes [18] o provendrían de la médula ósea [19]. Otros estudios sugieren que las células beta se formarían en individuos adultos por la transdiferenciación de células pancreáticas acinares [20] o células endocrinas que producen otras hormonas diferentes a la insulina [21]. Por último, añadir que además

de la formación de nuevos islotes y células beta, existen mecanismos de aumento (hipertrofia) y disminución (atrofia) del *tamaño de* las células que forman los islotes como respuesta a diferentes estímulos [22].

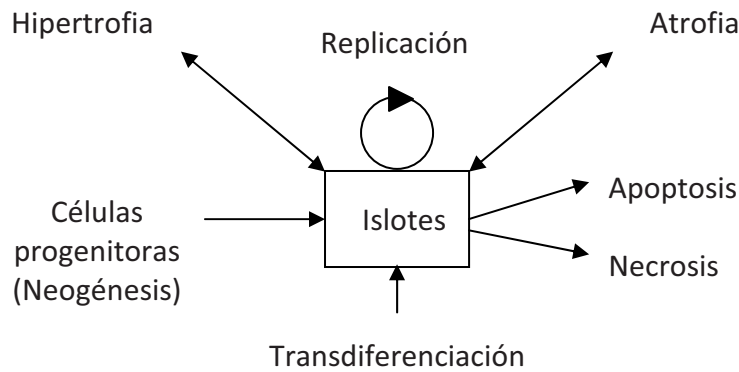


Fig. 2.- Esquema de los mecanismos de homeostasis de islotes y células beta.

2.2.2.- Formación y crecimiento en la etapa de embriogénesis

En la etapa de embriogénesis se producen los principales cambios en el páncreas, tanto en masa como en composición. Estudios realizados en roedores indican que la masa de islotes se forma principalmente en esta etapa [23]; por esta razón, si una hembra gestante sufre una restricción de nutrientes, especialmente de aminoácidos, acaba dando lugar a crías con una reducida masa de células beta [24]. Por otro lado, según transcurre la etapa de embriogénesis, la composición de los islotes va cambiando de forma que, por ejemplo, en el día gestacional 16 los fetos poseen islotes constituidos en su mayoría por células alfa (96%), mientras que justo antes del nacimiento hay una rápida expansión de las células beta, las cuales acaban siendo el 65% de los islotes y el porcentaje de células alfa baja hasta el 32% [23].

2.2.3.- Crecimiento post-natal^[7]

La masa de los islotes crece considerablemente desde el feto hasta la edad adulta, mientras que el volumen relativo respecto el total del páncreas disminuye progresivamente desde el nacimiento. En humanos recién nacidos, los islotes suponen un 20% del tejido pancreático, en niños de 1,5 a 11 años supone el 7,5% y en adultos el

1%. En ratas se han descrito valores similares. De todas formas, los valores porcentuales pueden dar lugar a un error de interpretación, puesto que la masa de islotes de un individuo adulto es cinco veces superior a la masa de islotes de un recién nacido. Los datos de disminución a nivel porcentual se deben a que en el mismo período de tiempo, la masa de tejido exocrino se incrementa 15 veces. Por ello, el crecimiento de la masa de islotes se ve diluido por el mayor incremento del crecimiento del tejido exocrino.

Tras el nacimiento (etapa neonatal), se observa en modelos de roedores que durante las 2-3 primeras semanas de vida el crecimiento del páncreas en su totalidad es inferior al del organismo entero, mientras que la masa endocrina pancreática en concreto no presenta un incremento hasta la tercera semana de vida. Este fenómeno de estancamiento de la masa endocrina no es debido a una disminución de la proliferación de las células beta, ya que éstas presentan una proliferación entre 8 y 10 veces superiores a los individuos adultos, si no que se debe a un aumento de la apoptosis (de 3 a 10 veces superiores respecto a individuos adultos). Ello sugiere que durante la etapa neonatal se produce una importante remodelación del páncreas endocrino [25].

En humanos se observa un comportamiento de la masa beta similar, habiendo un proceso de proliferación que decae paulatinamente desde la embriogénesis hasta los 6 meses de vida, momento en que se llega a niveles similares a las personas adultas. Un estudio reciente establece que durante la infancia y la juventud los islotes crecen en tamaño más que en número de islotes por páncreas y que el proceso de replicación es el principal proceso de crecimiento de la masa de células beta en estas etapas [26]. Por su parte los procesos de apoptosis son raros en el período de embriogénesis y a partir de los 6 meses de vida, habiendo un importante aumento de estos procesos en el período perinatal (desde los 2 meses antes del nacimiento hasta los 2 meses después del nacimiento) [27].

2.2.4.- Crecimiento en edad adulta

La masa de células beta continúa creciendo con la edad, aunque a un ritmo muy inferior a la etapa embriogénica y neonatal. Así, por ejemplo, se calcula que en una

rata de 100 días el 3% de las células beta son de nueva generación. Si se considera que hay un ratio de apoptosis similar, se ha calculado que la vida media de una célula beta está entre 30 y 90 días [28]. Otro estudio muestra que ratones de 12 meses de edad (edad correspondiente a la mitad de la esperanza de vida de un ratón) presentan índices de proliferación alrededor del 0,07% [29]. Por ello, se extrae la conclusión que el páncreas es un órgano que está en una renovación constante que decae con el paso del tiempo.

2.2.5.- Adaptación de la masa de células beta a la carga metabólica^[22]

Durante la edad adulta la masa de células beta sufre procesos adaptativos según las necesidades del organismo. Dos claros ejemplos de estos cambios son el embarazo y la obesidad.

Estudios en roedores muestran que la masa de células beta puede doblarse para compensar la carga metabólica que implica el feto. Aunque los estudios en humanos son limitados, se ha descrito una adaptación similar de la masa de células beta [30]. Este incremento de masa de células beta se debe principalmente a la replicación de células beta preexistentes por la acción de hormonas propias de este período como la prolactina y el lactógeno placentario [30]. Una vez se ha dado a luz, la masa de células beta vuelve a su estado inicial por procesos de apoptosis [31].

Otro ejemplo de incremento de la masa de célula beta es la obesidad, en la que se produce un aumento de la carga metabólica que el páncreas ha de compensar. Estudios en humanos describen que este aumento de masa de célula beta es debido a un aumento de la replicación y neogénesis [32]. Se debe tener en cuenta que el incremento observado en humanos (incremento de 1,5 veces [32]) es mucho más modesto al observado en modelos animales, que pueden llegar a multiplicar por 9 su masa de células beta [33]. Por último, cabe comentar que en la obesidad también se produce un aumento de la apoptosis, pero en aquellos individuos en que la obesidad transcurre sin padecer diabetes, los procesos de apoptosis son inferiores a los procesos de replicación y neogénesis, dando lugar a un balance positivo del incremento de masa de célula beta.

2.2.6.- Regeneración del páncreas endocrino en condiciones experimentales

En condiciones experimentales se ha demostrado que el páncreas posee una cierta capacidad de regeneración tras infringirle un daño. Así en modelos en los cuales se induce una pancreatectomía, con una reducción del 90% del páncreas, se observa una rápida regeneración del páncreas endocrino y exocrino, debido a procesos de replicación de tejidos diferenciados y procesos de neogénesis del epitelio ductal [34]. Otras metodologías, también han demostrado la capacidad de regeneración del páncreas como son el cubrimiento de la cabeza del páncreas con celofán [35] (da lugar a un proceso de inflamación y se observan procesos de neogénesis), ligación parcial de los ductos [36] (provoca una obstrucción de los ductos y un proceso de inflamación, en el que se observa un crecimiento de la masa de células beta por procesos de neogénesis), tratamiento de ratas neonatales con el tóxico selectivo de células beta estreptozotocina [37] o aloxano [38], ligación de las arterias pancreáticas [39] y expresión de niveles elevados de interferón- γ [40] u otros factores.

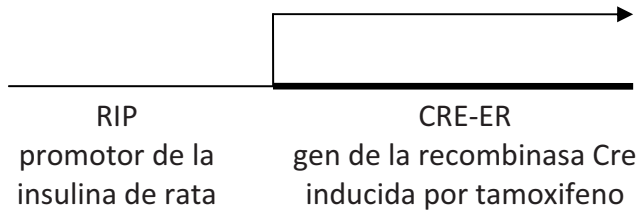
Cabe comentar que la capacidad de regeneración del páncreas endocrino se reduce con la edad en modelos murinos de regeneración pancreática (tratamiento con estreptozotocina, exendina 4 y pancreatectomía parcial), siendo mínima a los 12 meses de edad (edad correspondiente a la mitad de la esperanza de vida de un ratón) [41].

2.2.7.- Estado actual

Siempre ha existido un gran debate sobre cuál es el mecanismo que predomina en los procesos de regeneración de la masa de células beta (proliferación de las células beta, neogénesis, etc.). Mención especial requiere el estudio del grupo de Douglas A. Melton [42], que sin duda marcó un antes y un después en este ámbito. En el estudio publicado, Dor y colaboradores [42] utilizaron un sistema de trazado de linaje celular (Fig. 3), en el que a través de la recombinasa Cre inducida por tamoxifeno marcaron todas las células productoras de insulina y su descendencia. De esta manera, se podía saber si pasado un cierto tiempo desde el marcaje, las nuevas células beta provenían de células beta preexistentes que se habían replicado o bien si provenían de células no

beta, por transdiferenciación de células especializadas o por diferenciación de células progenitoras.

1.-



2.-

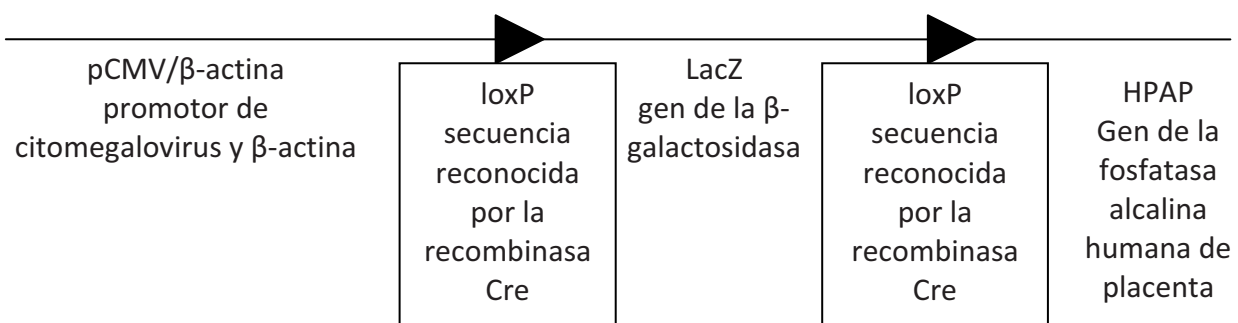


Fig. 3. Esquema de los constructos que portan los animales:

1. Permite la expresión de la recombinasa Cre inducida por tamoxifeno en células que producen insulina.
2. Expresa en todas las células el gen LacZ si no hay presencia de la recombinasa Cre y de HPAP si hay presencia de la recombinasa.

El marcaje de las células productoras de insulina se realizó por la inyección de tamoxifeno, que provocó que la recombinasa Cre se expresara (sólo en células productoras de insulina debido a que el constructo lleva el promotor de la insulina) y eliminara el gen LacZ del segundo constructo, de forma que el gen HPAP comenzase a expresarse. Así, las células que expresaban insulina en el momento del marcaje se transformaron en HPAP positivas, mientras que las células que no expresaban HPAP continuaban expresando LacZ. Cabe tener en cuenta que es conocido que la inducción de la recombinasa Cre por el tamoxifeno es limitada [43]. En este estudio, la eficiencia

fue de un 30%, con lo que en el momento del marcaje, el 30% de las células beta positivas fueron HPAP positivas.

Tras un cierto tiempo se sacrificaron los animales a los que se les había inyectado tamoxifeno y se les analizaron los islotes, pudiendo estar ante tres posibilidades (Fig. 4):

1. Islotes que se hubieran formado de *novo* después de la inyección de tamoxifeno, por procesos de transdiferenciación, neogénesis o provenientes de células progenitoras. Estos islotes serían totalmente negativos para HPAP.
2. Islotes generados por islotes existentes durante la inyección de tamoxifeno. Estos islotes serían HPAP positivos en alguna de sus células beta.
3. Islotes de ambos tipos.

En los animales que se analizaron, todos los islotes con más de 10 células presentaban alguna célula HPAP positiva, con lo que todos los islotes de un cierto tamaño provenían de células beta preexistentes. Por otro lado, alrededor del 80% de los islotes que contenían 10 o menos células (islotes que algunas veces han sido considerados como islotes formados de *novo* provenientes de células progenitoras o formados por transdiferenciación) contenían alguna célula HPAP positiva.

De esta forma, este grupo demostraba de una forma demoledora que en ratones adultos casi la única forma de producción de nuevos islotes era a través de la replicación de islotes ya preformados.

Por otro lado, este mismo grupo realizó este análisis en animales con una pancreatectomía del 70%, proceso que estimula la formación de nuevos islotes, observando de nuevo los mismos resultados.

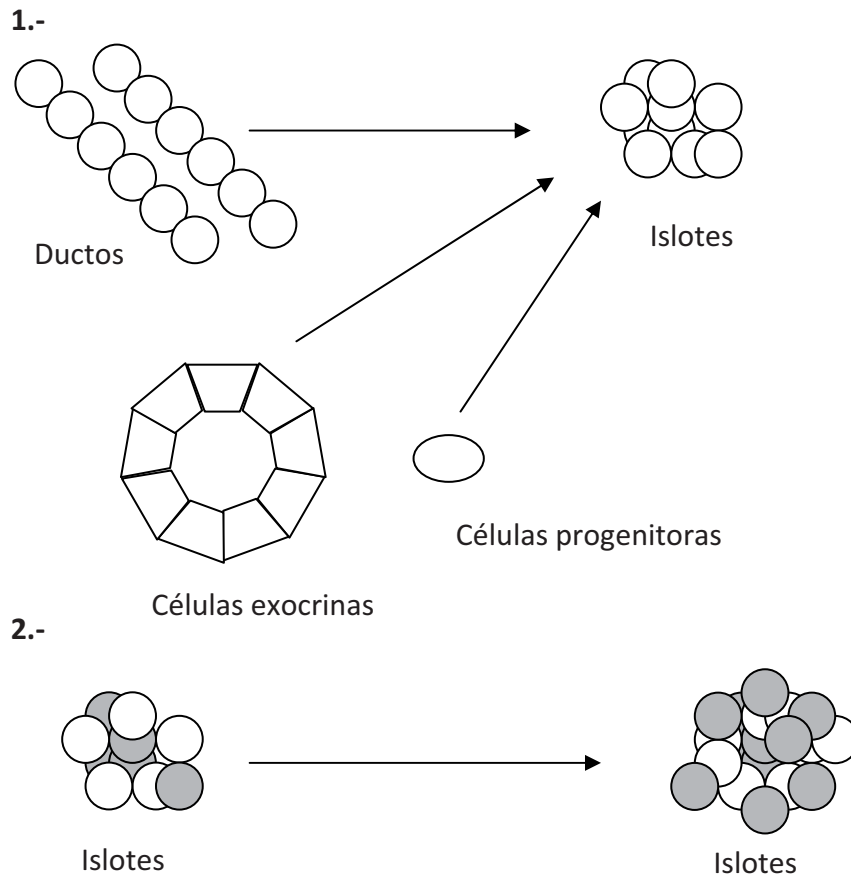


Fig. 4. Posibles resultados del experimento de Dor y colaboradores [42]:

1. Si los islotes se formasen por transdiferenciación, neogénesis o a través de células progenitoras, estos islotes no tendrían ninguna célula HPAP positiva.
2. Si los islotes se formasen por replicación de islotes preexistentes, los islotes tendrían células HPAP positivas.

Los círculos blancos representan células HPAP negativas, mientras que los círculos grises representan células HPAP positivas.

Además, en otro estudio el grupo del Dr. Melton demostró a través de la utilización de varios modelos transgénicos que todas las células de los islotes replicaban por igual, de forma que no existían grupos de células dentro de los islotes con una capacidad mayor de replicación y responsables del mantenimiento de la masa de células beta, si no que

todas las células beta contribuían por igual a la homeostasis de la masa de célula beta [44].

Los principales detractores de este estudio critican que la eficiencia de la recombinasa Cre sólo sea del 30%, la posibilidad que la recombinasa Cre se pueda activar sin previa estimulación de forma esporádica [45], el posible error a la hora de seleccionar los lóbulos que se regeneran [45] y el hecho que el estudio no se haya realizado en animales pancreatectomizados al 90% o en animales con los ductos ligados [46] (modelos animales que presentan niveles elevados de neogénesis). Así por ejemplo, dos estudios realizados en animales pancreatectomizados al 50% [47, 48] muestran que en estos animales no existen células progenitoras, mientras que dos estudios realizados en animales en los que se les ha practicado una ligación parcial de los ductos y a través de un trazado de linaje celular demuestran la existencia de procesos de neogénesis [46, 49].

De los estudios que demuestran procesos de neogénesis en el páncreas, cabe destacar el trabajo de Xu *et al.* [46], en el que detectan en la parte ligada del páncreas un acusado incremento de la expresión del gen neurogenina3 (*ngn3*), marcador de los progenitores embrionarios de los islotes (el animal KO (knock-out [genoanulado]) para *ngn3* no presenta islotes y muere postnatalmente de diabetes [50]). En este modelo animal de ligación de los ductos pancreáticos, cuando se silencia la expresión de este gen a través de la utilización de siRNA (small interference RNA [ARN pequeño de interferencia]) la regeneración de la masa de células beta disminuye notablemente, demostrando la importancia de este gen en este proceso. Además, observan que el 15% de las células *ngn3* positivas son también citoqueratina positivas (marcador de ductos), con lo que concluyen que los ductos pueden expresar *ngn3*. Por último, realizan un trasplante de las células *ngn3* positivas en embriones *ngn3* KO y observan que estas células son capaces de diferenciarse hasta células productoras de las diferentes hormonas endocrinas pancreáticas.

Con estos resultados, concluimos que en animales adultos sanos y en aquellos a los cuales se les infringe un daño moderado en el páncreas, la masa de células beta se mantiene principalmente por mecanismos de replicación [42], mientras que en animales con un daño pancreático marcado (como sería la ligación parcial de los

ductos) existen procesos de transdiferenciación o neogénesis de los ductos pancreáticos que ayudan a mantener la homeostasis de la masa de células beta [46, 49].

CONCEPTOS PARA RECORDAR

- El páncreas endocrino es tan sólo el 2-5% del páncreas total.
- Existen diferencias de distribución y estructura de los islotes entre roedores y humanos.
- Hay varios mecanismos que permiten mantener y adaptar la masa de célula beta frente a diferentes estímulos (replicación, transdiferenciación, neogénesis, células progenitoras, apoptosis, necrosis, hipertrofia y atrofia).
- El páncreas durante la embriogénesis y la etapa perinatal sufre importantes remodelaciones, en la que varios mecanismos ayudan a producir un páncreas adulto.
- En la etapa adulta, en un estado no patológico, las células beta se regeneran principalmente por procesos de replicación, tanto en roedores como en humanos. Este proceso disminuye conforme aumenta la edad del individuo.
- En roedores durante la etapa adulta, si se le infringe en el páncreas un daño moderado, el principal mecanismo que hace aumentar la masa de células beta es la replicación.
- En roedores durante la etapa adulta, si se le infringe en el páncreas un daño severo, aparecen mecanismos de transdiferenciación o neogénesis de los ductos pancreáticos que permiten aumentar la masa de células beta.

2.3.- Seguimiento de la masa de células beta: biomarcadores ^[51-53]

Para realizar un seguimiento de los procesos de homeóstasis de la masa de célula beta y poder estudiar los mecanismos responsables, es necesaria la utilización de biomarcadores que permitan determinar a lo largo del tiempo la cantidad de células beta que dispone un individuo. Por este motivo, el desarrollo e implementación de técnicas no invasivas para la monitorización espacio-temporal de la masa de célula beta en asociación con la medida de secreción de insulina podrían ser extremadamente útiles para:

1. Describir y predecir la dinámica de la masa de células beta.
2. Establecer un diagnóstico más temprano de patologías derivadas.
3. Establecer el mejor tratamiento posible.
4. Estudiar nuevos tratamientos enfocados a la preservación o regeneración de la masa de célula beta.

Hasta recientemente, tan sólo existían métodos indirectos para medir la masa de células beta. Éstos se basaban principalmente en la medida de los valores de insulina circulante tras diferentes estímulos metabólicos. La visualización directa de los propios islotes o de islotes trasplantados era infructuosa debido al pequeño tamaño de los islotes, la poca diferenciación de los islotes respecto al tejido que los rodea y su relativo bajo número y elevada dispersión en el páncreas y en otros tejidos en los que se trasplantan como el hígado. Por este motivo, la mayoría de los estudios sobre la dinámica de la masa de célula beta han sido realizados en modelos animales o en cadáveres humanos, ya que el riesgo que conlleva realizar biopsias pancreáticas es superior al beneficio que se pueda recibir.

En la actualidad, la tecnología ha avanzado y existen equipos diagnósticos con una elevada sensibilidad, como sería el PET (*positron emission tomography*, tomografía por emisión de positrones), SPECT (*single photon emission computed tomography*, tomografía computerizada de emisiones de un fotón), aparatos con resolución espacial (RMN, resonancia magnética nuclear) o ambos (PET/CT). Pero aunque la tecnología haya avanzado, el principal problema para la visualización de los islotes es la falta de

estructuras específicas o marcadores moleculares capaces de distinguir entre islotes dispersados y células beta aisladas respecto al tejido que los rodea.

El seguimiento de islotes trasplantados tiene la ventaja que éstos, previa a su implantación, pueden ser marcados de forma que se pueda realizar un seguimiento. En la actualidad, se están trabajando con varios marcadores como la ^{11}C -mannoheptulosa, nanopartículas de hierro recubiertas por carboxitextrano, agentes de contraste con lantano y gadolinio, ^{11}C -dihidotetrabenazina y compuestos de la familia de las sulfonilureas, como la gliburida.

La observación de la masa de células beta ya existente en un individuo es más compleja, ya que no se pueden marcar los islotes previamente. Para su determinación, se debe utilizar un marcador que detecte una proteína que cumpla los siguientes criterios:

1. Se exprese en el páncreas únicamente por las células beta.
2. Se exprese en la suficiente cantidad como para poder ser marcado y observado.
3. No se exprese en los órganos que rodean al páncreas para evitar el ruido de fondo.

Hasta el momento varios candidatos como la L-DOPA ((S)-2-amino-3-(3,4-dihidroxifenil) ácido propanoico), gliburida, tolbutamida, serotonina, nicotinamida, fluorodeoxiglucosa, fluoroditisona o anticuerpos específicos de islotes como el GAD, IA2 y el K24D10 han sido descartados, debido a que no se acumulan suficientemente en los islotes o bien no tienen la especificidad necesaria.

Actualmente se está trabajando principalmente sobre tres posibles candidatos: la dihidrotetrabenazina (DTBZ), el anticuerpo contra el transportador de zinc ZnT8 y el anticuerpo IC-2. La DTBZ se une al VMAT-2 (*vesicular monoamine transporter type 2*, transportador vesicular de monoaminas de tipo 2) que se encuentra en la célula beta. El principal inconveniente de este marcador es que VMAT-2 también se expresa en células dopaminérgicas y en otros tejidos como el endometrio y el tracto gastrointestinal. En cuanto al transportador de zinc ZnT8, presenta el inconveniente que se encuentra tanto en células beta como en células alfa, no siendo capaz de discriminar entre ambas. Por último, el anticuerpo IC2 contra la galactosa-3-sulfato

presente en los gránulos de insulina es específico para célula beta y se une con elevada afinidad, pero tiene el problema que es una inmunoglobulina de tipo M (IgM) realizada en rata y que por su elevado tamaño tiene problemas de accesibilidad y requiere una fragmentación previa.

La investigación en el campo de los biomarcadores continúa, de forma que en la literatura van apareciendo nuevos trabajos al respecto. Uno de estos estudios es el realizado por Akpinar et al. [54] que apuntó la posibilidad de utilizar el fragmento extracelular de la proteína de Transmembrana 27 (Tmem27) como biomarcador de masa de célula beta. Esta proteína, presente en las células beta pancreáticas y en las células renales proximales tubulares, tiene la característica que solo es escindida por las células beta y que la parte que se escinde (liberada en el compartimento extracelular) es proporcional a la masa de célula beta presente. Lo cual hace que si se desarrolla una técnica lo suficientemente sensible como para detectarla en plasma, tengamos una medida indirecta de la masa de célula beta presente en el individuo en el que se analice.

Por todo ello, en la actualidad aún no se puede hacer un seguimiento *in vivo* de la masa de células beta y más estudios en este campo son necesarios para poder realizar un análisis precoz, determinar la mejor terapia e investigar nuevas terapias relacionadas con el mantenimiento y regeneración de la masa de células beta.

2.4.- Secreción de insulina ^[6, 55]

La glucemia depende de la secreción de hormonas reguladoras como la insulina y el glucagón y de su acción en los tejidos diana. Por ello, tan importante es mantener una masa beta pancreática adecuada, como que estas células secreten de forma regulada y en cantidad suficiente la insulina.

La secreción de insulina es un proceso muy controlado. Éste se inicia cuando la célula beta detecta que en el torrente sanguíneo circula glucosa y a través del transportador de glucosa Glut-2 (probablemente Glut-1 en humanos) se produce un transporte rápido de la glucosa al citoplasma de la célula beta. Una vez en el interior de la célula beta, la glucosa es fosforilada rápidamente (elevada constante de K_m [constante de Michaelis]) por el enzima glucoquinasa (también llamado hexoquinasa VI) dando lugar

a glucosa-6-fosfato. A continuación se activa toda la vía de la glucólisis (glucosa-6-fosfato \rightarrow fructosa-6-fosfato \rightarrow fructosa-1,6-bisfosfato \rightarrow dihidroxiacetona-fosfato \rightarrow gliceraldehido-3-fosfato \rightarrow 1,3-bisfosfoglicerato \rightarrow 3-fosfoglicerato \rightarrow 2-fosfoglicerato \rightarrow fosfoenol piruvato \rightarrow piruvato). La glicólisis acaba dando lugar a la formación de 2 piruvatos, 2 NADHs (nicotinamida adenina dinucleótido hidrogenado) y 2 ATPs (adenosil trifosfato).

Los piruvatos formados entran en la mitocondria y tras su transformación a acetil-CoA (acetil-coenzima A) por la piruvato deshidrogenasa, entran en el ciclo de Krebs. Allí, los piruvatos se condensan con el oxalacetato dando lugar a citrato e iniciándose el ciclo de Krebs (citrato \rightarrow cis-aconitato \rightarrow D-isocitrato \rightarrow α -cetoglutarato \rightarrow succinil-CoA \rightarrow succinato \rightarrow fumarato \rightarrow malato \rightarrow oxalacetato). El rendimiento de la reacción por cada piruvato es de un GTP (guanosina trifosfato), 3 NADH y un FADH₂ (flavina adenina dinucleótido dihidrogenado). Los protones formados en forma de NADH y FADH₂ son aceptados por la cadena respiratoria mitocondrial, la cual a través de la ATPsintasa acaban generando ATP, el cual a través del intercambiador ATP/ADP, pasa al citoplasma.

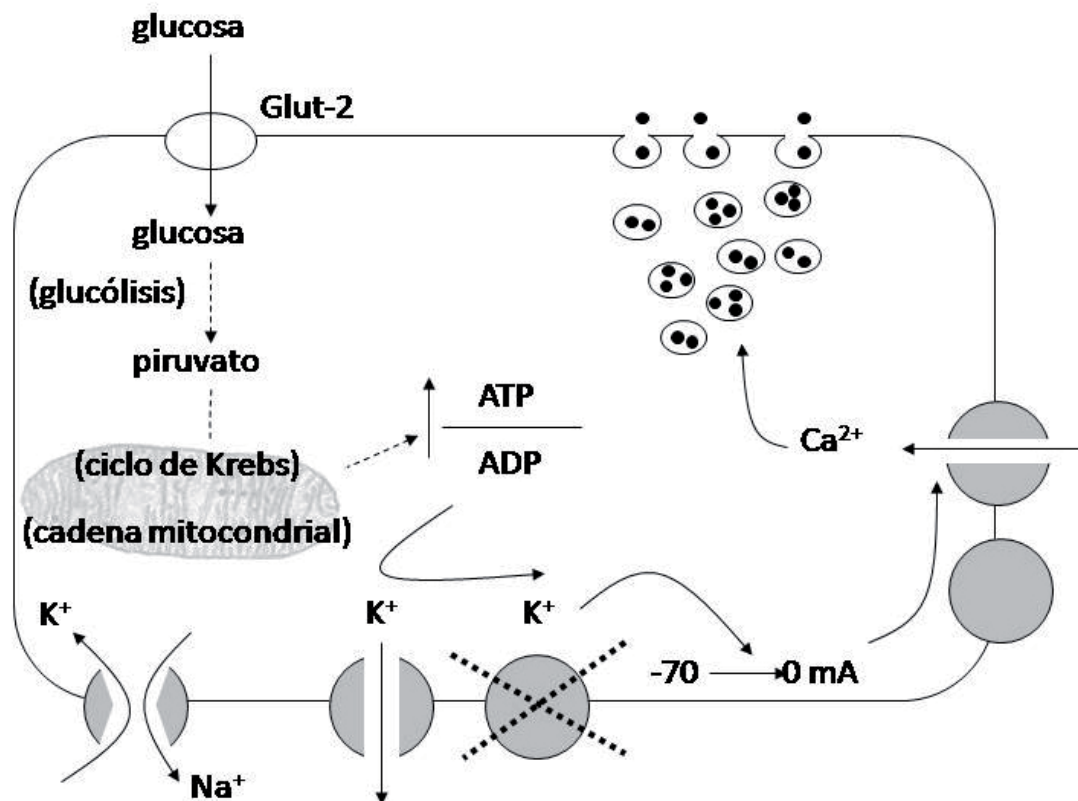


Fig. 5. Esquema de la secreción de insulina por la célula beta.

De esta forma el ratio ATP/ADP citoplasmático aumenta y provoca que el canal de potasio de la membrana citoplasmática ATP dependiente se cierre. Este hecho, junto con la actividad constante de la bomba de Na/K ATPasa, provoca que la membrana que inicialmente estaba polarizada (-70mV en la parte citoplasmática de la membrana) se despolarice. Todo ello conlleva que los canales de calcio voltaje-dependientes de tipo L de la membrana citoplasmática se abran, provocando la entrada de calcio desde el espacio extracelular al citoplasma (en el espacio extracelular el calcio está presente a concentraciones 10.000 veces superiores), lo que asimismo provoca que se inicie el proceso de exocitosis de los gránulos de insulina (Fig.5).

El proceso de exocitosis consta de dos fases, una primera fase aguda en la que se libera gran cantidad de insulina y una segunda fase en la que se mantienen los niveles de secreción de insulina (Fig. 6). Cabe comentar que el porcentaje de insulina que se libera, respecto a la cantidad almacenada, es muy pequeño. Así, por ejemplo en islotes de ratones se ha descrito que durante la primera fase de la secreción de insulina se libera un 0,14%/min. del contenido de insulina, mientras que en la segunda fase tan solo se libera un 0,05%/min. Además, cabe comentar que aunque cualquier estímulo que sea capaz de despolarizar la membrana produce la primera fase de secreción de la insulina (sulfonilureas o cloruro potásico por ejemplo), tan solo los estímulos que son capaces de producir un incremento en el ratio ATP/ADP provocan una secreción de insulina con las dos fases descritas.

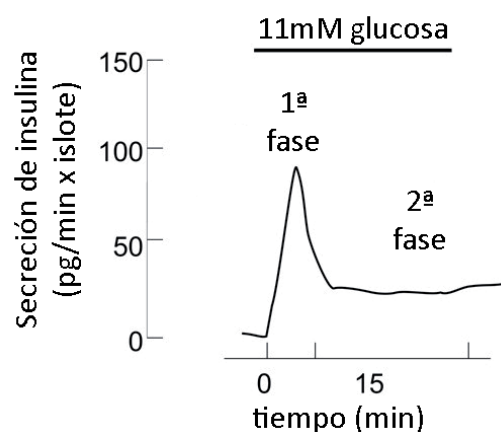


Fig. 6. Perfil de secreción de insulina inducida por glucosa en islotes aislados. Los niveles de glucosa se elevaron a 11mM tal como se indica en la barra horizontal. Nótese la presencia de una primera fase rápida de unos 10 min. y una segunda fase más lenta. Adaptado de [55].

Las proteínas responsables del inicio de la secreción de insulina en respuesta a un incremento del calcio citoplasmático aún no han sido definidas completamente, aunque se cree que podrían ser las proteínas sinaptotagminas que forman parte del complejo SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*, receptor del factor de unión soluble sensible a N-etilmaleimida).

El proceso de exocitosis de insulina tiene varias etapas en la que los gránulos se acercan, se amarran (*docking*) y se fusionan a la membrana citoplasmática, para liberar su contenido al espacio extracelular. Según en qué etapa estén los gránulos, éstos se clasifican en grupo de gránulos no asociados con la membrana citoplasmática, grupo amarrado pero no preparado para su liberación y grupo amarrado y preparado para su liberación (RRP, *ready releasable pool*). En el proceso de amarre y fusión participa el grupo de proteínas SNARE. De forma simplificada, en los gránulos está presente la proteína Vamp-2 (*vesicle-associated membrana protein 2*, proteína de membrana asociada a vesículas 2), mientras que en la membrana citoplasmática está la proteína Snap-25 (*synaptosome-associated protein of 25 kDa*, proteína asociada a sinaptosoma de 25 kDa) y sintaxina-I (*syntaxin*). La asociación entre éstas y otras proteínas citoplasmáticas provoca que el gránulo se amarre a la membrana citoplasmática y acabe fusionándose, produciendo la liberación de su contenido al espacio extracelular (Fig. 7).

En el complejo SNARE participan muchas otras proteínas, entre ellas se ha descubierto que la proteína de transmembrana Tmem27 se une a esnapina y ésta a Snap-25, participando todas ellas en el proceso de secreción de insulina.

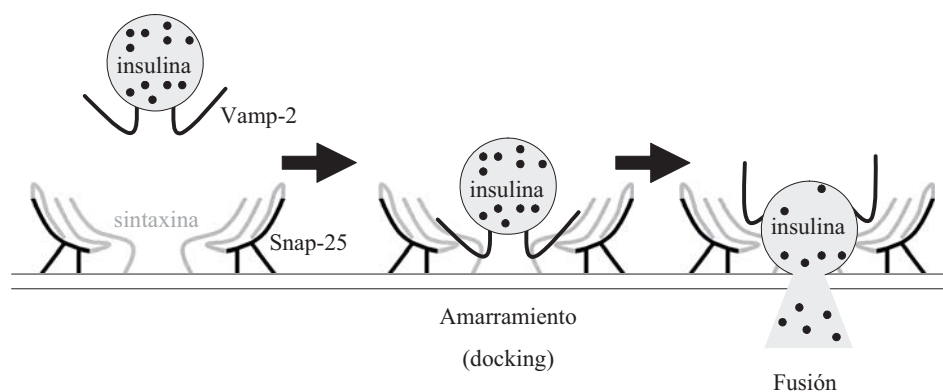


Fig. 7.- Proceso de secreción de un gránulo de insulina y principales moléculas implicadas del complejo SNARE.

3.- TUNGSTATO DE SODIO

En este apartado (además de una breve introducción) se describe lo que se conoce hasta el momento sobre el efecto del tungstato en los diferentes órganos y aunque el trabajo actual se basa en el páncreas, por razones históricas (el primer trabajo en el que se utilizó el tungstato para tratar la diabetes se centró en sus efectos sobre el hígado) la descripción de sus efectos en los diferentes órganos comienza por el hígado.

3.1.- Química, etimología e historia^[56]

El wolframio o tungsteno es un elemento químico de número atómico 74, situado dentro de los metales de transición y masa atómica 183.84. Su símbolo es W.

Su principal uso en la industria es en la formación de lámparas incandescentes, electrodos no consumibles de soldaduras, resistencias eléctricas y en aleaciones con acero para la fabricación de aceros especiales para maquinaria de corte a elevada velocidad. A nivel internacional se considera un material estratégico, de forma que por ejemplo Estados Unidos mantiene reservas de 6 meses de este mineral.

La palabra tungsteno proviene del sueco, significando tung “pesado” y sten “piedra”, con lo que vendría a significar “piedra pesada”. Nombre dado por el geólogo sueco Alex Fredrik Cronsted en 1758 y aislado por primera vez en 1783 por Juan José Elhúyar y Fausto Elhúyar.

3.2.- Bioquímica – Tungstato de sodio como inhibidor de fosfatasas

El tungstato (sal neutra del tungsteno), al igual que otros oxoaniones metálicos como el molibdato, vanadato y cromato, presenta la capacidad de inhibir a fosfatasas y sulfatasas [57]. El mecanismo molecular de inhibición de fosfatasas del tungstato se realizó a través del estudio del mecanismo de interacción entre el tungstato y el enzima tirosina fosfatasa de proteínas (PTPase, *protein tyrosine phosphatase*) del género de bacterias *Yersinia* [58]. En este estudio, los autores demuestran que el oxoanión tungstato entra dentro del centro catalítico de este enzima, compitiendo con grupos fosfato unidos a tirosinas, provocando un cambio conformacional del enzima y dando lugar a su inhibición. Además, otros estudios han descrito la capacidad de

inhibición del tungstato sobre otras fosfatasa (glucosa-6-fosfatasa [59], proteína PhoN (proteína ácida fosfatasa que pertenece a la superfamilia de proteínas PAP2 [*phosphatidic acid phosphatase type 2*, fosfatasa del ácido fosfatídico tipo 2] [60]), fosfatasa Six A (histidina fosfatasa [61]), etc.).

3.3.- Tungstato y diabetes

La idea del uso del tungstato de sodio para el tratamiento de la diabetes provino del hecho que una serie de metales de transición en su forma de oxoanión (molibdato, vanadato, cromato y tungstato) tenían la propiedad de inhibir a fosfatasa y sulfatasas [57] y que uno de estos oxoaniones, el vanadato, demostró su capacidad de tener una acción “insulino-mimética”, ya que administrado en el agua de bebida a animales diabéticos (diabetes inducida por el tóxico selectivo de célula beta estreptozotocina) produce una disminución de la hiperglucemia [62], mejora la expresión de los enzimas exocrinos como la amilasa (también afectados en los animales diabéticos) [63], mejora la función cardíaca [62], estimula la captación de glucosa por el hígado y el músculo [64], restaura la expresión de los enzimas hepáticos glucosa-6-fosfatasa [65], glicógeno sintasa y fosforilasa [66] y 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa [67], etc. En una primera aproximación, el grupo del Dr. Guinovart observó que tanto el molibdato como el tungstato ejercían acciones similares (aunque con una menor potencia) al vanadato en hepatocitos en cultivo [68], lo que podría significar que ambas moléculas podrían tener efectos similares al vanadato.

3.4.- Efectos del tungstato sobre el hígado

Tras observar las similitudes entre el vanadato, molibdato y tungstato en hepatocitos en cultivo, Barberà y colaboradores [69] trataron ratas diabéticas por estreptozotocina (STZ) con tungstato en el agua de bebida, observando efectos similares a los producidos por el vanadato: normalización de la glucemia, recuperación parcial o total de la expresión de los enzimas hepáticos 6-fosfofructo-2-quinasa, L-piruvato quinasa, glicógeno fosforilasa, glucoquinasa y glicógeno sintasa y recuperación parcial de los niveles de glucosa-6-fosfato. Además, estos efectos fueron observados en menor medida en animales no diabéticos, excepto en el caso de la glucemia, que no presentó

variaciones. Este estudio fue el que abrió el camino a la investigación del posible uso del tungstato en el tratamiento de la diabetes.

Posteriormente, un estudio realizado en microsomas de hepatocitos de rata demostró que el tungstato de sodio era un potente inhibidor del enzima hepático glucosa-6-fosfatasa [59], hecho que justificaría, junto con el incremento de la actividad del enzima glucoquinasa [69], la recuperación parcial de los niveles de glucosa-6-fosfato observados en los animales diabéticos tratados con tungstato.

Además, un estudio en ratas diabéticas por estreptozotocina tratadas con tungstato a largo término (8 meses), observó los efectos ya descritos sobre la normalización de la glucemia y los enzimas hepáticos en los animales diabéticos tratados, junto con una disminución de la nefropatía y retinopatía asociada a una hiperglucemia crónica y una disminución de la mortalidad de los animales diabéticos [70].

Estudios posteriores realizados en ratas ZDF (*Zucker Diabetic Fatty*, ratas Zucker diabéticas y obesas) que desarrollan con la edad obesidad, hiperlipidemia, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa e hiperglucemia, demostraron que el tungstato era capaz de restaurar parcialmente el metabolismo hepático de la glucosa y disminuir los efectos negativos derivados de la lipotoxicidad [70]. En concreto, el tratamiento con tungstato de sodio dio lugar a una disminución de la glucemia y triglicéridos en sangre (sin llegar a normalizarse), una recuperación parcial de la tolerancia a la glucosa, una normalización de la actividad del enzima glicógeno fosforilasa alfa y de la expresión fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK, Phosphoenolpyruvate carboxykinase) y un incremento de la expresión piruvato quinasa hepática (L-PK, liver pyruvate kinase) y sintasa de ácidos grasos (FAS, *fatty acid synthase*).

Por último, se procedió a analizar en profundidad los mecanismos moleculares por los que el tungstato de sodio estaba ejerciendo sus efectos sobre el hígado a través del tratamiento de hepatocitos de rata y células CHOIR (células CHO [*Chinese Hamster Ovary*, Ovario de Hamster Chino [71]] que sobreexpresan el receptor de insulina humano [72]) con tungstato de sodio. Observándose que esta molécula estaba actuando principalmente sobre la cascada de señalización de MAPK (*mitogen-activated protein kinase*, proteína quinasa activada por mitógenos), tal como se presenta esquemáticamente en la Figura 8.

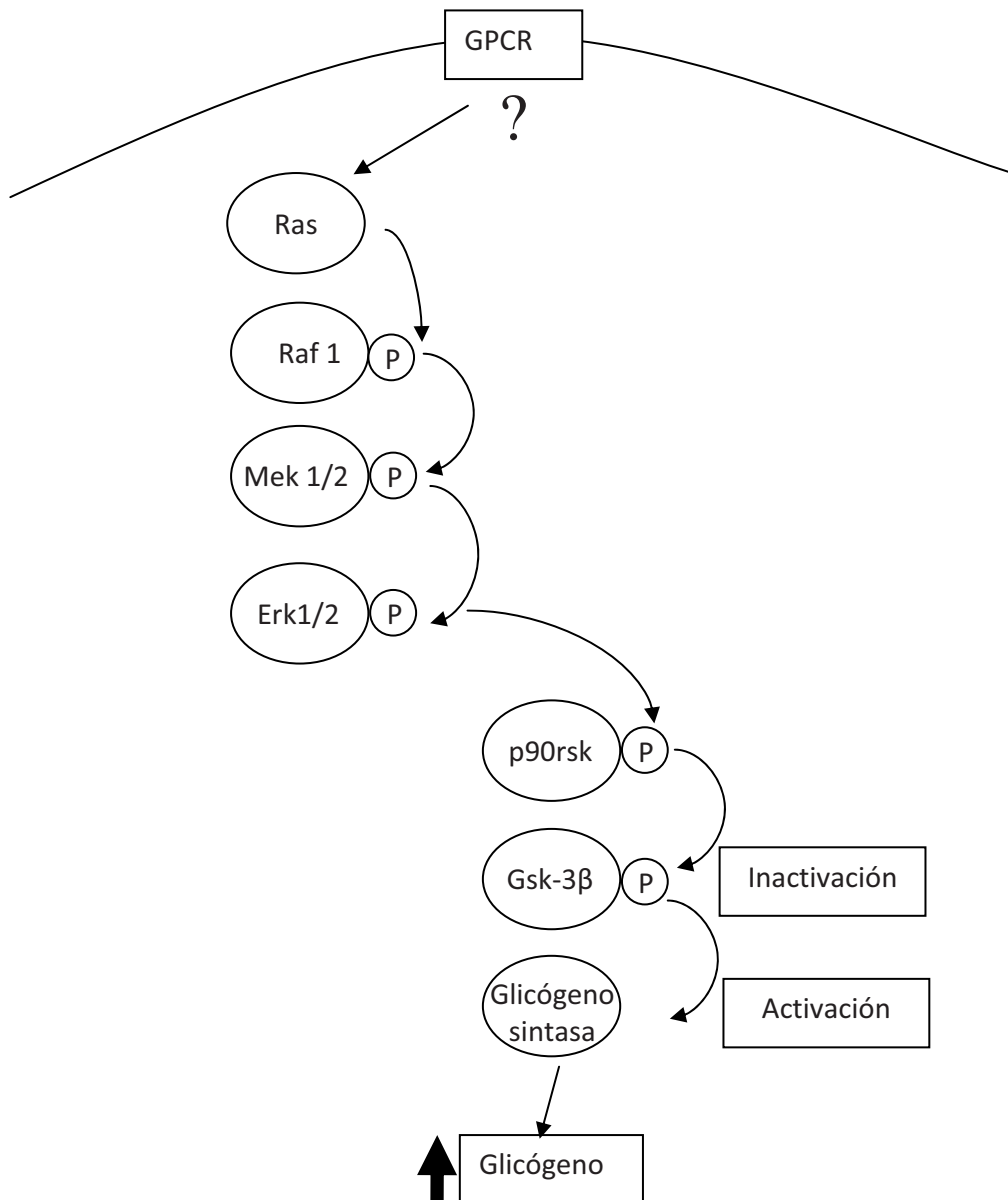


Fig. 8. Vía sobre la que actúa el tungstato de sodio en células CHO-R.

En concreto se observó que el tungstato de sodio estaba actuando a través de una proteína G actualmente sin identificar [73], de forma que ésta activaba Ras (formado por K-Ras, H-Ras y N-Ras, que significa respectivamente *v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* [homólogo del oncogen viral del sarcoma de rata *v-Ki-ras2 Kirsten*], *Harvey rat sarcoma virus oncogene 1* [oncogen 1 del virus del sarcoma de rata Harvey] y neuroblastoma ras oncogene [oncogen ras de neuroblastoma]), y fosforilaba y activaba Raf (*v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1* [homólogo del oncogen viral de la leucemia murina *v-raf-1*]), Mek1/2 (*MAPK/ Erk kinase 1/2* [quinasa

de MAPK/ Erk 1/2]), Erk1/2 (*extracellular signal-regulated kinase 1/2*, quinasa de regulación de señales extracelulares 1/2) y p90rsk (*90 kDa ribosomal S6 kinases*, proteína quinasa de la proteína ribosomal S6 de 90 kDa). Ésta última provocaba la fosforilación e inactivación de Gsk-3 β (*glycogen synthase kinase 3 β* , quinasa de la sintasa de glicógeno 3 β) y la consiguiente activación de glicógeno sintasa, la cual daba lugar a un aumento de los niveles de glicógeno [3].

3.5.- Efectos del tungstato sobre el páncreas

Un primer estudio demostró que el tratamiento con tungstato de sodio en ratas en las que al nacer se les inyectaba estreptozotocina (modelo de ratas diabéticas tratadas con estreptozotocina en el período neonatal, nSTZ), provocaba una normalización de la hiperglucemia, junto con un incremento de la secreción de insulina en islotes aislados y estimulados con glucosa, de los niveles de insulina (proteína y mRNA), del número de células beta en el páncreas y de los niveles de glucosa-6-fosfato en el hígado [74]. Estudios posteriores demostraron que en este modelo animal el tungstato también era capaz de incrementar la insulinemia, el número de células beta que contenían los islotes y los procesos de neogénesis (células insulina-positivas en contacto con los ductos y células pdx-1 positivas en el tejido exocrino [pdx-1, pancreático y duodenal homeobox 1, gen imprescindible para la formación del páncreas [75] y cuya aparición en el páncreas en células no beta o no delta se considera como sinónimo de procesos de neogénesis [76]). También se observó un incremento de la fosforilación de pdx-1 y p38 en los islotes, significando un aumento de la actividad de ambas proteínas y sugiriendo que p38 activaba a pdx-1, la cual daba lugar a un incremento de la síntesis de insulina. Además, se observó que cuando el tratamiento se retiraba los animales continuaban siendo normoglucémicos [2].

Paralelamente, se realizaron estudios sobre el páncreas perfundido para profundizar en los efectos del tungstato sobre la secreción de insulina. Así, se observó que el tungstato era capaz de potenciar la secreción de insulina inducida por glucosa [77]; potenciación que fue bloqueada por diazóxido (abre los canales de potasio ATP-dependientes), somatostatina (abre los canales de potasio ATP dependientes, disminuye la actividad del enzima adenilato ciclasa y posiblemente interfiere con los

procesos exocíticos) y amilina (actuaría sobre un supuesto receptor unido a proteínas G de provocaría una disminución de los niveles de AMPc [adenosil monofosfato cíclico] [78]). Además, el tungstato de sodio era capaz de potenciar la secreción de insulina inducida por arginina (aminoácido que una vez dentro de la célula beta provoca un cambio de potencial de membrana), exendina-4 (análogo de GLP-1 [*glucagon-like peptide-1*, péptido similar al glucagon-1] que incrementa el calcio citoplasmático y el AMPc), tolbutamida (cierra los canales de potasio ATP-dependientes) y glucagón (hormona endocrina que aumenta el AMPc), mientras que bloquea la secreción de somatostatina inducida por estos mismos agentes [79] y no modifica la secreción de glucagón [77]. Para descartar que el efecto que se veía sobre la secreción de insulina no fuese un efecto secundario, siendo el efecto primario la actuación sobre las células productoras de somatostatina, se trabajó con un páncreas sin somatostatina (eliminada por el tratamiento con cisteamina) y se observó de nuevo que el tungstato era capaz de inducir la secreción de insulina en presencia de arginina. Por todo ello, se propuso que el tungstato actuaba de manera directa sobre las células beta para incrementar la secreción de insulina.

Por último, se procedió a analizar los mecanismos moleculares por los que el tungstato de sodio estaba ejerciendo sus efectos sobre los islotes a través del tratamiento de células MIN6 con tungstato de sodio (MIN6, células provenientes de un insulinoma de ratón obtenido del animal transgénico que sobreexpresa el antígeno-T mayor del virus del simio 40 (SV40) en las células beta pancreáticas [80]). Piquer et al. [4] demostraron que, de forma diferente a lo que sucede en el páncreas perfundido [77, 79], el tungstato de sodio añadido a células MIN6 en cultivo no era capaz de estimular la secreción de insulina inducida por glucosa, si no que tan sólo era capaz de aumentar la secreción basal de insulina. Además, estos autores demostraron que en las células MIN6, el tratamiento con tungstato de sodio provocaba un aumento de la fosforilación de las proteínas p-38 y PI3K (*phosphoinositol-3-kinase*, [fosfoinositol-3-quinasa]) en medios de cultivo sin suero ni glucosa y al mismo tiempo había un aumento de la translocación de PDX-1 hacia el núcleo, fenómenos ya observados en los animales nSTZ tratados con tungstato [2]. Este proceso de translocación se justificó a través del

aumento de fosforilación de p-38 y PI3K y el aumento de la secreción basal de insulina se justificó por el aumento de fosforilación de p-38.

3.6.- Efectos del tungstato sobre el tejido adiposo

Los efectos del tungstato de sodio sobre el tejido adiposo han sido ampliamente estudiados. El primer estudio realizado demostró que un derivado peroxidado del tungstato, el pertungstato, daba lugar a un aumento de la captación de glucosa por adipocitos de rata aislados [81].

La primera descripción de los efectos beneficiosos del tratamiento con tungstato sobre animales obesos fue realizada por Claret y colaboradores [82]. Utilizando ratas obesas (obesidad inducida por una dieta denominada de cafetería), se observó que la administración de tungstato daba lugar a una disminución de la ganancia de peso y de la adiposidad, sin influenciar la ingesta calórica, la absorción intestinal de grasas o el ratio de crecimiento. Además, estos fenómenos iban acompañados de una mejora en los perfiles lipídicos en sangre (normalización de triglicéridos y NEFA [non esterified fatty acid, ácidos grasos no esterificados]) y una disminución de la resistencia a la insulina. La causa de la disminución de peso, sin modificar la ingesta ni la absorción de nutrientes, se encontró en:

1. Un incremento a nivel del tejido adiposo de la entrada de ácidos grasos en las mitocondrias y posterior oxidación a través de un incremento de los genes involucrados en el transporte (LPL [lipoproteinlipasa] y aP2 [factor de transcripción AP-2]) y en la oxidación (mCPT1 [mitochondrial carnitinapalmitoiltransferasa 1]) de ácidos grasos.
2. Un aumento de la disipación de energía, incrementando la expresión de las proteínas desacopladoras en tejido adiposo marrón (UCP1 [uncoupling protein 1, proteína desacopladora 1]) y tejido adiposo blanco (UCP2 y UCP3).

Posteriormente se procedió a la caracterización proteica de los tejidos adiposo blanco [82] y marrón [83] de las ratas obesas por dieta de cafetería y tratadas con tungstato de sodio. En el tejido adiposo blanco se determinó que el 70% de las proteínas identificadas que se modificaban por la obesidad eran revertidas por el tratamiento

con tungstato y se hallaron 10 nuevas proteínas reguladas por el tratamiento y no reguladas por la obesidad. En términos generales, estas proteínas estaban implicadas en la modulación de la estructura celular, metabolismo, estado redox y procesos de señalización. En cuanto al tejido adiposo marrón, el tratamiento con tungstato afectaba a proteínas implicadas en el ciclo de Krebs, glicólisis, lipólisis, oxidación de ácidos grasos, transporte de electrones y estado redox.

A continuación, un estudio de Canals y colaboradores demostró elegantemente el papel crucial que juega la leptina en el efecto del tungstato sobre los animales obesos [84]. En esta investigación se utilizaron dos modelos de animales deficientes en el receptor (ratas Zucker *fa/fa*) y en la propia leptina (ratones *ob/ob*), en los que el tungstato de sodio no fue capaz de reducir el incremento de peso corporal. Cuando a estos modelos animales se les restableció la cantidad de leptina circulante (a través de un trasplante de tejido adiposo de animales no deficientes en leptina en los ratones *ob/ob*), el tungstato de sodio comenzó a realizar sus efectos sobre el peso corporal, lo que significaba que para su acción necesitaba que la vía de señalización por leptina fuese funcional. En este estudio también se observó que los neuropéptidos hipotalámicos *Npy* (neuropéptido Y), *Agrp* (*Agouti related protein*, proteína relacionada con *Agouti*) y *Cart* (*cocaine and amphetamine responsive transcript*, transcrito que responde a cocaína y anfetamina), implicados en la regulación de la homeostasis regulada por leptina, se modificaban por el tratamiento con tungstato de una manera similar a las modificaciones que produce la leptina, apuntando a un papel del sistema nervioso central en los efectos del tungstato sobre la obesidad.

Por último, se procedió a analizar los mecanismos moleculares por los que el tungstato de sodio estaba ejerciendo sus efectos sobre el tejido adiposo a través del tratamiento de fibroblastos 3T3-F442A diferenciados a adipocitos [85] y tratados con tungstato de sodio. En este modelo los adipocitos tratados presentaron una disminución en la acumulación de triglicéridos y en la diferenciación adipocitaria, observándose una disminución de la expresión de genes claves para la función adipocitaria: *aP2*, *ACC* (acetil-CoA carboxilasa) y *FAS* (*fatty acid synthase*, sintasa de ácidos grasos) y de diferenciación adipocitaria: *C/EBP α* (*CCAAT enhancer-binding protein*, proteína potenciadora de unión a CCAAT) y *PPAR γ* (*peroxisome proliferator-activated receptor γ* ,

receptor de peroxisoma activado por proliferación γ). Por otro lado, C/EBP β isoforma LIP (*C/EBP β isoforma liver-enriched inhibitory protein*, C/EBP β isoforma inhibitoria enriquecida en el hígado) se presentó disminuido, hecho que justificaría la inhibición de la diferenciación adipocitaria observada tras el tratamiento con tungstato. Además, estos cambios fueron parcialmente bloqueados al inhibir la vía de las Mapk a la altura de Erk1/2 y p38, demostrando una vez más el papel crucial que desempeña la vía de las Mapk para el efecto del tungstato de sodio. Por último, este estudio, observó un aumento del consumo de oxígeno por los adipocitos tratados con tungstato.

3.7.- Efectos del tungstato de sodio sobre otros órganos

El tratamiento con tungstato de sodio sobre ratas diabéticas también tiene efectos beneficiosos sobre el aparato reproductor. Así, este tratamiento en ratas diabéticas por estreptozotocina macho dio lugar a una recuperación de la actividad sexual, de las concentraciones en sangre de glucosa, insulina, hormona luteinizante (*luteinizing hormone*, LH), hormona folículo estimulante (*follicle-stimulating hormone*, FSH) y testosterona. Además, se observó una recuperación del número de células de Leydig junto con un aumento de la expresión del receptor de insulina. A nivel molecular se observó un incremento de la fosforilación de Mapk y Gsk-3 [86]. En cuanto a las ratas hembras, tras provocarles un estado diabético inducido por estreptozotocina y tratarlas con tungstato de sodio, se observó un incremento de la libido, de la fertilidad y de los niveles de LH y FSH. En el ámbito molecular se observó una normalización en los ovarios del transportador de hexosa Glut-3 (*glucosa transporter 3*, transportador de glucosa 3) y de los receptores de estrógeno, progestágeno y FSH, mientras que en el útero se produjo una normalización de la expresión de los receptores Glut-3 y FSH [87].

Sobre el sistema nervioso central, un estudio realizado en animales diabéticos por estreptozotocina demostró que el tratamiento con tungstato de sodio normalizaba la actividad de CK (*Creatinin Kinase*, quinasa de creatinina) (elevada en animales diabéticos), sin modificar la actividad de otros enzimas también elevados (AST, aspartato aminotransferasa y ALT, alanina aminotransferasa) [88]. Por otro lado, un grupo de investigadores ha demostrado que el tungstato de sodio en el cerebro, al igual que sucede en los hepatocitos, es capaz de fosforilar Erk1/2, la cual acaba

provocando la fosforilación e inactivación de Gsk3 β . La inactivación de Gsk3 β en el cerebro da lugar a que la proteína tau no se hiperfosforile [89]. Este fenómeno se ha observado tanto en las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y como en extractos de córtex cerebral de ratas obesas e insulina resistentes inducidas por dieta de cafetería. Teniendo en cuenta que esta proteína tau hiperfosforilada, junto con el péptido amilode- β es responsable de la formación de los depósitos que acaban dando lugar a la enfermedad de Alzheimer, el descubrimiento que el tungstato de sodio disminuye la hiperfosforilación de tau abre la puerta a la posibilidad del uso de esta sal para la prevención de la enfermedad de Alzheimer.

A nivel del sistema inmunitario, un trabajo centrado en las células circulantes del sistema inmunitario en animales diabéticos por estreptozotocina y tratados con tungstato desveló que el tratamiento lograba normalizar total o parcialmente el número de leucocitos, el número y el porcentaje de linfocitos y neutrófilos, las inmunoglobulinas en suero, la actividad de los neutrófilos y el índice de inmunocomplejos solubles [90].

Respecto al sistema circulatorio y el corazón, utilizando el modelo de animal diabético inducido por una dieta rica en fructosa, se observó que el tratamiento con tungstato de sodio prevenía la hipertensión y la hiperrespuesta a norepinefrina asociados a esta dieta [91]. En otro estudio realizado en animales diabéticos inducidos por estreptozotocina, se concluyó que la administración de tungstato a los animales diabéticos producía una disminución de triglicéridos y ácidos grasos libres circulantes, una mejora en el test de tolerancia oral a glucosa y una mejora en varios parámetros cardíacos (presión ventricular izquierda, ratio de contracción y ratio de relajación) [92].

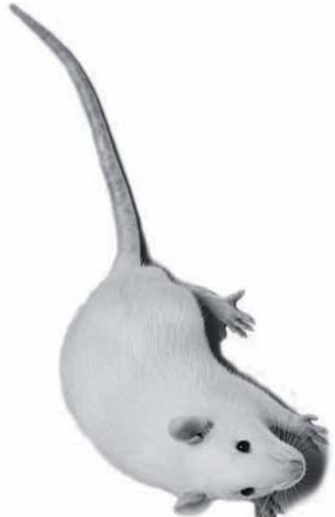
En cuanto al intestino, el tratamiento con tungstato en animales diabéticos inducidos por estreptozotocina provocó que en la membrana luminal de los enterocitos del yeyuno se produjera una disminución de la actividad del enzima sucrasa (por un mecanismo post-traducciona) y una normalización de la expresión de Sglt1 (*Sodium/Glucosa transporter 1*, transportador de sodio y glucosa 1).

Por último, los efectos del tungstato sobre el músculo se estudiaron en músculo aislado *soleus* y en la línea celular L6.C11. Así, el tratamiento del tejido muscular aislado *soleus* con tungstato de sodio dio lugar a un incremento del transporte de

glucosa por este tejido [93]. Por otro lado, estudios moleculares sobre la línea celular L6.C11 proveniente de mioblastos de músculo esquelético de rata y transformados en miotubos, concluyeron que el aumento de transporte de glucosa era debido a un aumento en la cantidad y en la translocación a membrana del transportador de glucosa Glut-4, hecho que era dependiente del incremento de fosforilación por parte del tungstato de Erk1/2, del aumento de transcripción de MEF2 (*myocyte enhancer factor 2*, factor de potenciación de miocitos 2) y de su capacidad para activar la transcripción de Glut-4 [94].

PARA RECORDAR

Fig. 9. Resumen de los órganos y efectos del tungstato en diferentes modelos animales (en **negrita** el órgano sobre el que actúa, subrayado el modelo en el que se describe la acción):



TEJIDO ADIPOSO
Cafetería:
Disminución de la ganancia de peso corporal
Incremento entrada y oxidación de ácidos grasos en mitocondrias
Implicación LPL, aP2 y mCPT1
Aumento de la disipación de energía
Implicación PGC-1 α , UCP1, UCP2 y UCP3
Zucker *fafa*, ratones ob/ob:
Rol clave de la leptina
Implicación de neuropéptidos hipotalámicos Npy, Agrp y Cart.
fibroblastos 3T3-F442A:
Disminución de acumulación de triglicéridos y diferenciación adipocitaria
Implicación de aP2, ACC, FAS, C/EBP α , PPAR γ , C/EBP β isoforma LIP y MAPK (Erk y p38)

CEREBRO
STZ:
Normalización actividad CK
Cafetería y SH-SY5Y:
Proteína tau no hiperfosforilada
Implicación MAPK (Erk) y GSK-3 β

PÁNCREAS
nSTZ:
Aumento producción insulina
Aumento secreción insulina inducida por glucosa
Implicación Pdx-1 y MAPK (p38)
Páncreas perfundido:
Aumento secreción insulina estimulada por varios segretagogos
MIN6:
Aumento secreción basal de insulina
Implicación Pdx-1 y MAPK (p38)

MÚSCULO
Soleus aislado:
Aumento captación glucosa
L6.C11:
Aumento captación glucosa
Implicación Glut4, vía MAPK (Erk) y MEK2

HÍGADO
STZ: Mejora enzimas hepáticas
ZDF: Mejora enzimas hepáticas
Hepatocitos y CHO-R: Implicación vía MAPK y GSK-3 β . Aumento de glicógeno

APARATO REPRODUCTOR
STZ:
Machos: Recuperación de la actividad sexual y de LH, FSH y testosterona
Implicación vía MAPK (Erk) y Gsk-3.
Hembras: Incremento de libido, fertilidad y niveles de LH y FSH
Implicación Glut3, receptores de estrógeno, progesterógeno y FSH

SISTEMA CIRCULATORIO Y CORAZÓN
STZ:
Mejora glicemia
Disminución de triglicéridos y ácidos grasos libres circulantes
Mejora parámetros cardíacos

SISTEMA IMMUNITARIO
STZ:
Mejora nº de leucocitos, linfocitos, neutrófilos e inmunoglobulinas

INTESTINO
STZ:
Disminución de la actividad de la sucrasa y normalización de Sglt1

4.- TRANSMEMBRANA 27 (TMEM27)

4.1.- Descripción en el riñón

La proteína transmembrana27 o Tmem27 también es conocida como collectrina (collectrin), debido a que la primera vez que se describió se encontró localizada en los ductos colectores de los riñones [95]. Su hallazgo fue debido al análisis de los genes cuya expresión aumentaba en los riñones de los ratones a los que se les extirpaba el 85% del riñón. Se observó que compartía una cierta homología con el enzima convertidor de angiotensina 2 (*angiotensin converter enzyme, ACE2*), ya que conservaba los dominios citoplasmático, transmembranal y extracelular no catalítico, pero no contenía el dominio catalítico (Fig. 10).

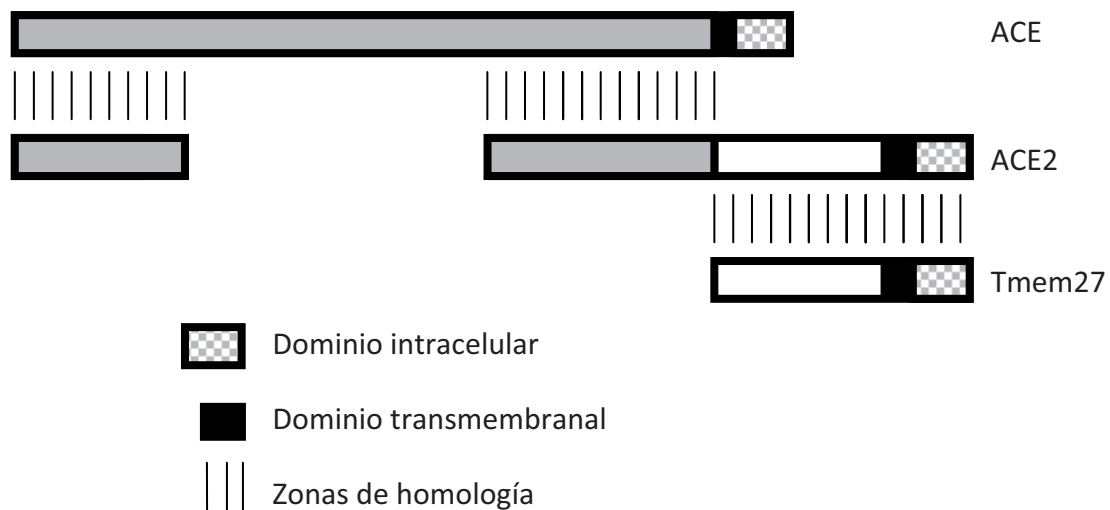


Fig. 10. Homologías entre ACE, ACE2 y Tmem27. Adaptado de Zhang y colaboradores [95].

Además, se examinó su localización en diferentes órganos, observándose que tan solo se expresaba en el riñón. Por otro lado, a través de predicciones estructurales de esta molécula, se describió que Tmem27 contiene un péptido señal y que se haya O-glicado y N-glicado [95] (Fig. 11).

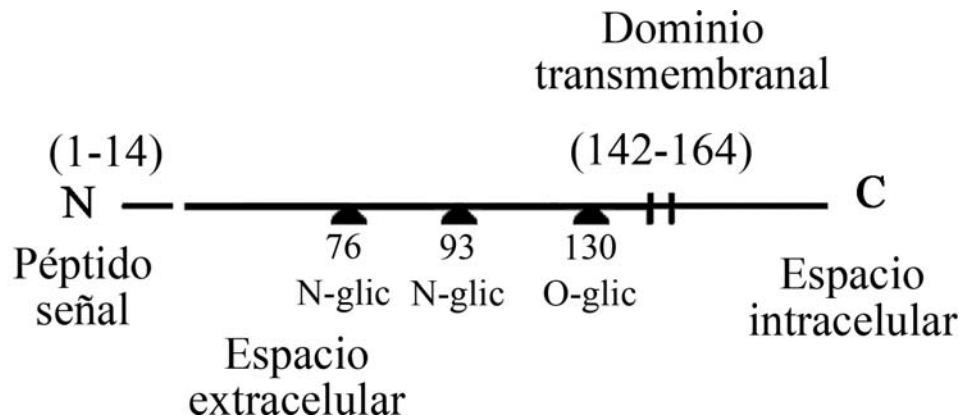


Fig. 11. Representación esquemática de las modificaciones post-traduccionales y los diferentes dominios de Tmem27. Adaptado de Zhang y colaboradores [95].

Por último, este estudio sugirió que Tmem27 podría estar implicado en procesos de organogénesis renal o tener un papel en procesos de fallo renal.

Dos estudios posteriores [96, 97] desarrollados por grupos independientes llegaron a conclusiones muy similares entre sí y divergentes con el primer estudio realizado [95]. Estos trabajos se basaron en los resultados obtenidos con el KO total de Tmem27. Las conclusiones a las que llegaron fueron:

1. Tmem27 no se expresaba en los ductos colectores del riñón, si no que se expresaba en las células tubulares proximales.
2. El animal KO era viable, con lo que se descartaba el posible rol de Tmem27 en la organogénesis renal, y presentaba diuresis osmótica debido a que estaba excretando gran cantidad de aminoácidos por la orina.
3. Se observó que el silenciamiento de Tmem27 daba lugar a una disminución en la expresión de varios transportadores de aminoácidos (B^0AT1 [*system B0 neutral amino acid transporter*, transportador de aminoácidos neutros del sistema B0], rBAT [*cystine, dibasic and neutral amino acid transporters*, transportador de aminoácidos neutros, dibásicos y cisteína] y $b^{0,1}AT$ según [96] y B^0AT1 , XT3s1/SIT1 [*X transporter protein 3 similar 1*, proteína similar 1 a la proteína transportadora X 3], XT2 [*X transporter protein 2*, proteína transportadora X 2] y XT3 según [97]). Este hecho provocaba que la reabsorción

de aminoácidos en los túbulos proximales estuviese disminuida, dando lugar a la diuresis osmótica.

En dos publicaciones realizadas por el grupo del Dr. Makino, quien describió por primera vez Tmem27, se insiste en que Tmem27 también se encuentra en los túbulos colectores y que allí juega un papel en el mantenimiento de los cilios y la polaridad celular [98], que interacciona con el complejo SNARE a través de esnapina, Snap-23, Vamp-2 y syntaxina-4 y que una reducción de Tmem27 provoca una reducción en el canal de sodio α -epitelial, ATPasa de protones y la acuaporina-2 [98].

4.2.- Descripción en el páncreas

Contradiendo el primer artículo en que se exponía que Tmem27 tan sólo se expresaba en los riñones [95], aparecieron dos artículos de forma simultánea realizados por dos grupos independientes en que a partir del KO para HNF-1 α (*hepatocyte nuclear factor 1 α* , factor nuclear hepático 1 α) describieron la presencia de Tmem27 en los islotes pancreáticos [54, 99]. Además, describieron que Tmem27 estaba regulado por HNF-1 α , HNF-1 β [99] y Pdx-1 [54], que se expresaba exclusivamente en las células beta [54] y alfa [99] y que era modificado post-traduccionalmente por glicosilaciones. A partir de aquí, ambos estudios entran en constantes contradicciones:

Por un lado, el estudio de Fukui y colaboradores [99] establece:	Por el otro lado, está el estudio de Akpınar [54] en el que se demuestra que:
Tmem27 colocaliza con insulina y dentro de las células beta se halla en la periferia de los gránulos grandes de secreción.	Tmem27 no colocaliza ni con insulina ni con sinaptofisina, si no que se sitúa en la membrana perinuclear y plasmática en proximidad con las vesículas de fusión, colocalizando con Glut-2.
Cuando se sobreexpresa en una línea celular de un insulinoma de rata (INS-1), éstas aumentan la cantidad de insulina secretada estimulada por glucosa, y cuando se silencia disminuye la cantidad de insulina secretada.	Cuando se sobreexpresa en una línea celular de un insulinoma de ratón (Min-6), éstas aumenta su proliferación y a la inversa, cuando se silencia disminuye su proliferación.

<p>Se demuestra la interacción física de Tmem27 con esnapina (miembro de la familia SNARE).</p>	<p>Se demuestra que Tmem27 es cortado únicamente en las células beta y que la parte extracelular se libera de forma constitutiva, lo cual permite que si somos capaces de valorar esta parte, tengamos una medida indirecta de la masa de células beta.</p>
<p>Al realizarse el animal que sobreexpresa Tmem27 en las células beta, se observa que estos animales tienen aumentada la secreción de insulina inducida por glucosa respecto a los WT (<i>wild type</i>, cepa salvaje), mientras que el área pancreática de células beta no varía entre animales transgénicos y WT.</p>	<p>Al proceder a realizar el transgénico con la sobreexpresión de Tmem27 en las células beta, se observa que estos animales no presentan diferencias en la secreción de insulina inducida por glucosa. Además, el área pancreática de células beta es superior en los animales transgénicos respecto a los WT.</p>

Para añadir un poco más de confusión al papel que desempeña Tmem27 en los islotes, un estudio reciente en el que se observa la morfología del páncreas y la secreción de insulina inducida por glucosa en animales KO para Tmem27 [100], demuestra que estos animales no presentan ni variaciones en la masa de célula beta ni diferencias en la secreción de insulina. Tan sólo al cabo de seis meses de vida se vuelven más sensibles a la insulina, seguramente como causa secundaria de la pérdida constante de nutrientes por la orina y la disminución del peso que ello conlleva.

PARA RECORDAR

- En el riñón Tmem27 está implicado en la reabsorción de aminoácidos en los túmulos renales proximales.
- En el páncreas se localiza en los islotes, pero su papel no está claro, podría estar implicado en procesos de secreción de insulina y/o de proliferación.
- Estudios previos indican que su parte extracelular podría ser un marcador de masa de célula beta.



Pedraforca

2497 m

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1.- HIPÓTESIS

1.1.- Mecanismos de regeneración del páncreas endocrino

Los mecanismos por los cuales el páncreas es capaz de regenerarse tras realizarle un daño están parcialmente definidos y su descripción permitiría descubrir nuevas vías para abordar el tratamiento de la diabetes.

Teniendo en cuenta que se han descrito los efectos beneficiosos del tratamiento con tungstato de sodio sobre el páncreas endocrino en modelos animales de diabetes y en el páncreas perfundido, tanto sobre su capacidad de regeneración como de su funcionalidad [2, 4, 74, 77, 79], se planteó la hipótesis que, investigando los cambios de expresión génica en el páncreas de la de rata diabética tratada con tungstato, se podrían desvelar algunas de las vías implicadas en la regeneración del islote pancreático.

1.2.- Papel de Tmem27 en el seguimiento de la masa y proliferación del páncreas endocrino y en la secreción de insulina

Estudios previos describieron a la proteína de transmembrana 27 (Tmem27) como una proteína situada en las células beta pancreáticas, cuyo incremento era sinónimo de un aumento en la proliferación celular y a la inversa [54]. Además, se propuso su posible utilidad como biomarcador de masa de célula beta. Por ello, teniendo en cuenta que disponíamos de un modelo animal de regeneración de páncreas endocrino, se realizó la hipótesis que Tmem27 confirmaría el incremento de masa y de proliferación celular beta pancreática.

Tras comprobar que Tmem27 no nos permitía reconfirmar el incremento de proliferación detectado en los islotes de los animales tratados con tungstato y teniendo en cuenta que se había sido descrito su participación en procesos de secreción de insulina [99], se realizó la hipótesis que Tmem27 estaría participando en procesos de secreción de insulina.

2.- OBJETIVOS

2.1.- Investigar los mecanismos de regeneración pancreática por los cuales actúa el tungstato de sodio en las ratas diabéticas a través de:

- 2.1.1. Caracterizar morfológicamente los cambios que induce el tratamiento con tungstato de sodio en el páncreas de ratas sanas y diabéticas.
- 2.1.2. Establecer los mecanismos de expresión génica por los que el tungstato realiza su efecto regenerativo a través de microarrays.
- 2.1.3. Diferenciar entre los efectos directos producidos por el tratamiento con tungstato de sodio de aquellos efectos indirectos debidos a la disminución de la hiperglucemia de los animales diabéticos.
- 2.1.4. Caracterizar en detalle alguna de las vías de acción del tungstato de sodio.

2.2.- Investigar el papel de Tmem27 en la secreción de insulina, proliferación beta pancreática y su posible uso como marcador de masa beta pancreática:

- 2.2.1. Estudiar la expresión de Tmem27 en los islotes del modelo animal de ratas sanas tratadas y no tratadas con tungstato de sodio.
- 2.2.2. Establecer la localización de Tmem27 en el páncreas humano y en diferentes modelos animales.
- 2.2.3. Determinar la expresión de Tmem27 en islotes provenientes de donantes humanos con y sin diabetes de tipo 2.
- 2.2.4. Establecer correlaciones de expresión génica entre Tmem27 y diferentes genes relacionados con el ciclo celular y la secreción de insulina en islotes de donantes humanos sin diabetes.
- 2.2.5. Sobrexpresar Tmem27 en cultivos primarios (islotes) y células provenientes de insulinoma de rata y observar como varían la secreción de insulina inducida por glucosa y la proliferación celular.

2.2.6. Observar si la rotura y liberación de Tmem27 es específica de células beta.



Pica d'estats

3143 m

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- RNA

1.1.- Extracción RNA

1.1.1.- Preparación de la muestra

La extracción de RNA a través del método del fenol/cloroformo descrito en el apartado 1.1.2 debe ser siempre que sea posible a partir de tejido recién extraído. En caso que no sea posible, se puede tratar la muestra recién extraída con RNAlater (Ambion).

Para las muestras tratadas con TRIzol (apartado 1.1.3), si no se puede proceder a la extracción del RNA en el momento de la extracción, se puede homegenizar el tejido o las células con TRIzol y conservar la muestra homogenizada a -80°C.

Protocolo RNAlater:

1. Sumergir la muestra fresca en 5-10 volúmenes (peso/volumen) de RNAlater (ej. 1g de páncreas, 5-10 ml de RNAlater).
2. Dejar la muestra a 4°C durante 12 horas.
3. Eliminar el RNAlater por decantación.
4. Congelar la muestra a -80°C.

1.1.2.- Método de purificación por separación en fenol/cloroformo

Este protocolo permite la extracción de RNA de un tejido como el páncreas, en el que la integridad del RNA se ve seriamente comprometida por la enorme cantidad de RNasas presentes en el tejido (otros protocolos como la utilización de TRIzol no permiten obtener un RNA íntegro).

Este protocolo está basado en la separación del RNA por métodos de bifases orgánicas-acuosas, junto con procesos de precipitación en alcohol. Debido al alto contenido de RNasas estos procesos se repiten de forma encadenada para asegurar que en la muestra no quedan RNasas que puedan degradar el RNA.

No se recomienda procesar más de 3 o 4 muestras simultáneas, ya que ello evita que se realicen los pasos con rapidez, punto fundamental para no comprometer la integridad del RNA.

Las muestras se deben mantener siempre en hielo, a no ser que se diga lo contrario en algún punto del protocolo.

Antes de comenzar hay que asegurarse que:

1. Todo el material está limpio en un ambiente libre de RNAsas.
2. Los reactivos están y deben conservarse en frío (se reduce la oxidación del reactivo fenol, al entrar en contacto con las muestras que contienen RNAsas el frío reduce su velocidad de acción, etc.).
3. Las centrifugadoras están limpias en un ambiente libre de RNAsas y frías.

Protocolo para un páncreas de rata (~ 1g de tejido):

1. Extracción por tiocianato de guanidina (*guanidine thiocyanate*)

- 1.1. Añadir 12 mls de solución desnaturante en un tubo de 30 ml (por ejemplo, Nalgene® PPCO #3119-0050) y enfriar en hielo.
- 1.2. Extraer el páncreas del animal e introducirlo en el tubo.
- 1.3. Homogenizar con un homogenizador del tipo Ultra turrax (por ejemplo, IKA-WERKE®, Ultra turrax T8-10) o similar a velocidad media para evitar un recalentamiento de la muestra.
- 1.4. Añadir una décima parte del volumen inicial (1,2ml) de acetato sódico 2M.
- 1.5. Añadir un volumen igual al inicial (12mls) de fenol:cloroformo:isoamil alcohol (*phenol:chloroform:isoamyl alcohol*, PCI) y agitar vigorosamente durante 10 seg.
- 1.6. Poner la muestra en hielo durante 15 min.
- 1.7. Centrifugar a 10.000g durante 20 min a 4°C.
- 1.8. Recoger el sobrenadante (fase superior acuosa) utilizando una pipeta estéril y transferirlo a un tubo nuevo de 30ml. El DNA y las proteínas permanecen en la

interfase (blanca) y en la fase orgánica (fase inferior), con lo que es muy importante no apurar mucho la fase acuosa, evitando coger la interfase y la fase orgánica.

2. Repetir extracción por PCI

- 2.1. A la fase acuosa añadir 12 mls de PCI y agitar vigorosamente durante 10 segs.
- 2.2. Dejar la muestra en hielo durante 5 mins.
- 2.3. Centrifugar a 10.000g durante 20 min a 4°C.
- 2.4. Recoger la fase superior (fase acuosa) utilizando una pipeta estéril y transferirla a un tubo nuevo de 30ml, con cuidado de no arrastrar la interfase o la fase inferior.

3. Precipitar el RNA

- 3.1. Añadir al tubo que contiene la fase acuosa 12 mls de isopropanol.
- 3.2. Incubar la muestra a -20°C durante 20 min.
- 3.3. Centrifugar la muestra a 10.000g durante 20 min a 4°C.
- 3.4. Descartar el sobrenadante sin desenganchar el precipitado blanco (pellet).

4. Extracción por PCI

- 4.1. Resuspender el pellet en 5 mls de solución desnaturizante.
- 4.2. Añadir 500 µL de acetato sódico 2M.
- 4.3. Añadir 5 mls de PCI y agitar vigorosamente durante 10 segs.
- 4.4. Dejar la muestra en hielo durante 5 mins.
- 4.5. Centrifugar a 10.000g durante 20 min a 4°C.
- 4.6. Recoger la fase superior (fase acuosa) utilizando una pipeta estéril y transferirla a un tubo nuevo de 30ml, con cuidado de no arrastrar la interfase o la fase inferior.

5. Precipitar el RNA

- 5.1. Añadir al tubo que contiene la fase acuosa 5 mls de isopropanol.
- 5.2. Incubar la muestra a -20°C durante 20 min.
- 5.3. Centrifugar la muestra a 10.000g durante 20 min a 4°C.
- 5.4. Descartar el sobrenadante sin desenganchar el precipitado blanco (pellet).

6. Extracción por hidroclorehidrato de guanidina (guanidine hydrochloride)

- 6.1. Resuspender el pellet en 10 mls de solución hidroclorehidrato de guanidina.
- 6.2. Añadir 10 mls de PCI y agitar vigorosamente durante 1 min.
- 6.3. Centrifugar a 10.000g durante 20 min a 4°C.
- 6.4. Recoger la fase superior (fase acuosa) utilizando una pipeta estéril y transferirla a un tubo nuevo de 30ml, con cuidado de no arrastrar la interfase o la fase inferior.

7. Precipitar el RNA

- 7.1. Añadir al tubo que contiene la fase acuosa 0,5 mls de acetato sódico 2M.
- 7.2. Añadir 10 mls de etanol 100%.
- 7.3. Incubar la muestra a -20°C durante 20 min.

En este punto el protocolo se puede parar por un período de tiempo razonable.

- 7.4. Centrifugar a 10.000g durante 20 min a 4°C.
- 7.5. Descartar el sobrenadante sin desenganchar el precipitado transparente-blanquinoso (pellet).

8. Precipitar el RNA

- 8.1. Resuspender el pellet en 1 ml de solución de hidroclorehidrato de guanidina.
- 8.2. Distribuir el mililitro en 2 eppendorfs de 1.5 ml (0,5 ml + 0,5 ml).
- 8.3. Añadir a cada eppendorf 50 µL de acetato sódico 2M.
- 8.4. Añadir a cada eppendorf 1 ml de etanol 100%.
- 8.5. Incubar las muestras a -20 °C durante 15 mins.

8.6. Centrifugar a máximas revoluciones durante 10 min a 4°C (por ejemplo 20800g en una centrífuga refrigerada Eppendorf 5417R).

8.7. Descartar el sobrenadante sin desenganchar el precipitado transparente-blanquinoso (pellet).

9. Lavar el RNA

9.1. Añadir a cada eppendorf 1 ml de etanol al 70%.

9.2. Centrifugar a máximas revoluciones durante 5 mins a 4°C.

9.3. Descartar el sobrenadante.

9.4. Resuspender el pellet en 400µL de agua libre de RNasas (por ejemplo agua tratada con DEPC [dietil pirocarbonato]).

10. Precipitar el RNA

10.1. Añadir a cada eppendorf 60µL de acetato sódico 2M.

10.2. Añadir a cada eppendorf 1 ml de etanol 100%.

10.3. Incubar las muestras a -80°C durante 15 min.

10.4. Centrifugar a máximas revoluciones durante 10 min a 4°C.

10.5. Descartar el sobrenadante.

11. Lavar el RNA

11.1. Añadir a cada eppendorf 1 ml de etanol al 70%.

11.2. Centrifugar a máximas revoluciones durante 5 mins a 4°C.

11.3. Descartar el sobrenadante.

12. Lavar el RNA

12.1. Añadir a cada eppendorf 1 ml de etanol al 70%.

12.2. Centrifugar a máximas revoluciones durante 5 mins a 4°C.

12.3. Descartar el sobrenadante.

12.4. Hacer una centrifugada breve de la muestra (spin).

12.5. Acabar de descartar el sobrenadante con una pipeta.

12.6. Dejar secar a temperatura ambiente el pellet.

12.7. Resuspender el pellet en 0,5 ml de agua libre de RNasas.

Soluciones:

1. Solución desnaturalizante (guardar a 4°C)

#Z5651 Promega. Contiene:

- 26mM citrato sódico (pH 4,0)
- 0,5% N-lauril sarcosina
- 0,125M β -mercaptoetanol
- 4M tiocianato de guanidina

Se puede sustituir por #30911 Fluka. Solución desnaturalizante para el aislamiento de RNA BioUltra, para biología molecular. Contiene:

- 25mM citrato sódico
- 0,5% N-lauril sarcosina
- 4M tiocianato de guanidina

A este reactivo se le debe añadir 0.125M β -mercaptoetanol (Sigma). Se recomienda añadirlo justo antes de realizar el protocolo.

2. Solución de hidroclorehidrato de guanidina (guardar a 4°C)

- 6M hidroclorehidrato de guanidina (Sigma)
- 0,025M EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) (Sigma)
- 0,0107M β -mercaptoetanol (Sigma). Se recomienda añadirlo justo antes de realizar el protocolo.

3. Fenol: Cloroformo: Isoamil alcohol (PCI), 99:24:1 (guardar a 4°C)

Se adquirió a Promega (actualmente no se comercializa).

Contiene:

- 99ml fenol
- 24ml cloroformo
- 1ml isoamil alcohol

Recubierto con 50 ml de 42mM citrato sódico, pH 4,3-4,7.

Se puede sustituir por:

- # 77619 Fluka. Fenol:Cloroformo:Isoamil alcohol 125:24:1 mezcla BioUltra, para biología molecular.
- # P3803 Sigma. Fenol:Cloroformo:Isoamil alcohol 25:24:1

4. Acetato sódico 2M

Se adquirió a Promega (actualmente no se comercializa).

Se puede sustituir por:

- # 71196 Sigma. Solución de acetato sódico BioUltra, para biología molecular, ~3 M en H₂O. Se debe llevar a 2M con agua libre de RNasas.

5. Isopropanol (Sigma)

6. Etanol 70% (Panreac)

7. Etanol 100% (Panreac)

8. Agua libre de RNasas (Ambion)

Cuando se realizó este protocolo la mayoría de estos reactivos, excepto la solución de hidroclorehidrato de guanidina, los alcoholes y el agua se adquirieron con el kit de Promega® “RNAgents® Total RNA Isolation System” (Cat. No. # Z5110).

Promega ya no comercializa este kit, de forma que los productos individuales deben ser adquiridos por separado o utilizar un kit comercializado por Ambion, cuyo contenido es similar (ToTALLY RNA™ Kit).

Cantidades utilizadas para 1 g de tejido:

1. Solución desnaturalizante: 17 mls.
2. Solución de hidroclorehidrato de guanidina: 11 mls.
3. PCI: 39 mls.
4. Acetato sódico 2M: 2,42 mls.
5. Isopropanol: 17 mls.
6. β -mercaptoetanol: 8,25 μ L.
7. Etanol 100%: 14 mls.
8. Etanol 70%: 6 mls.
9. Agua libre de RNAsas: 1,8 mls.

Tamaños de tubo y cantidades de reactivos necesarios para cantidades de tejido diferentes:

Este protocolo fue diseñado para trabajar con páncreas de rata que pesan aproximadamente 1g.

Para pesos diferentes, con las cantidades de reactivos en los primeros pasos se adjunta la siguiente tabla:

Tamaño de tubo (mínimo)	Tejido	Solución desnaturizante	Acetato sódico 2M	PCI
30ml	1.000mg	12ml	1.200µl	12ml
30ml	750mg	9ml	900µl	9ml
15ml	500mg	6ml	600µl	6ml
15ml	250mg	3ml	300µl	3ml
15ml	100mg	1,2ml	120µl	1,2ml
2ml	75mg	900µl	90µl	900µl
1,5ml	50mg	600µl	60µl	600µl
1,5ml	25mg	300µl	30µl	300µl
0,5ml	10mg	120µl	12µl	120µl
0,5ml	5mg	60µl	6µl	60µl

1.1.3.- Método de purificación por TRIzol

Este método de extracción de RNA se basa en los mismos principios que la extracción anterior (separación en una bifase acuosa-orgánica, seguida de precipitación) y básicamente utiliza un reactivo distribuido por Invitrogen, el TRIzol.

Este método se utilizó para extraer el RNA de muestras sin alto contenido en RNasas como tejido hepático y células en cultivo.

Protocolo:

1. Homogenización de células en cultivo

- 1.1. Aspirar el medio de cultivo de las células.
- 1.2. Añadir DPBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*, solución salina tamponada de fosfatos de Dulbecco) (Sigma) para cubrir las células.
- 1.3. Aspirar el DPBS.
- 1.4. Añadir DPBS para cubrir las células.
- 1.5. Aspirar el DPBS.
- 1.6. Poner la placa sobre una superficie fría (hielo).
- 1.7. Añadir 1 ml de TRIzol a una superficie de 10-20 cm².
- 1.8. Raspar la placa con la ayuda de un scraper (raspador), de forma que todas las células se arranquen y se rompan.
- 1.9. Recoger el TRIzol en un eppendorf o en un tubo adecuado según el volumen.

1. Homogenización de tejidos

- 1.1. Añadir TRIzol en un tubo tipo Falcon de 12 ml o similar en cantidad suficiente para el tejido que se vaya a procesar (100mg de tejido – 1ml de TRIzol).
- 1.2. Poner el tubo en hielo y añadir la muestra a procesar.
- 1.3. Homogenizar la muestra con un homogenizador tipo Ultra turrax o similar, a velocidad moderada para evitar un recalentamiento de la muestra.

2. Separación de fases

- 2.1. Incubar la muestra con TRIzol durante 5 min a temperatura ambiente.
- 2.2. Añadir 0,2ml de cloroformo por cada mililitro de TRIzol utilizado en la homogenización inicial.
- 2.3. Agitar durante 15 segundos vigorosamente.
- 2.4. Dejar en reposo, para que las fases se separen, durante 3 minutos a temperatura ambiente.

2.5. Centrifugar a 12.000g durante 15 min a 4°C.

2.6. Recoger la fase superior (acuosa) y transferirla a un tubo nuevo.

3. Precipitación del RNA

3.1. Añadir 0,5ml de isopropanol por cada mililitro de TRIzol que se haya utilizado para realizar la homogenización inicial.

3.2. Incubar las muestras durante 10 min a temperatura ambiente.

3.3. Centrifugar a 12.000g durante 10 min a 4°C.

4. Lavado del RNA

4.1. Eliminar el sobrenadante con mucho cuidado de no despegar el pellet del fondo del tubo.

4.2. Añadir 1ml de etanol al 70% por mililitro de TRIzol utilizado para realizar la homogenización inicial.

4.3. Agitar la muestra.

4.4. Centrifugar a 7.500g durante 5 min a 4°C.

5. Redisolución del RNA

5.1. Eliminar el sobrenadante con mucho cuidado de no despegar el pellet del fondo del tubo.

5.2. Centrifugar a 7.500g durante 30 seg a 4°C.

5.3. Acabar de eliminar todo el sobrenadante.

5.4. Dejar secar a temperatura ambiente el pellet.

5.5. Resuspender el pellet en agua libre de RNasas (la cantidad dependerá de la cantidad de RNA que hayamos extraído).

1.1.4.- Método de purificación por columnas (RNeasy mini kit)

Este método de purificación se basa en la capacidad de unas resinas de sílica gel para captar fragmentos de RNA superiores a las 200 pb (pares de bases). Este kit está distribuido por Qiagen.

Debido a su precio (el TRIzol es más barato), este método se reservó para la extracción de RNA de islotes por que presenta una serie de ventajas:

1. No hay posibilidad de arrastrar DNA y proteínas por causa del arrastre de fases e interfase a la hora de recoger la fase superior en métodos basados en separación bifásica.
2. Permite tratar el RNA con DNasa en la propia columna donde se aísla.
3. Permite eluir el RNA en volúmenes pequeños, de manera que podemos obtener concentraciones de RNA razonables, cuando se trabaja con poca cantidad de tejido.
4. No dependemos que el pellet sea visible, cuando se trabaja con poca cantidad de tejido.

Protocolo:

1. Homogenización

- 1.1. Partir de un pellet de islotes, conteniendo un mínimo de 200 islotes y un máximo de 400 islotes.
- 1.2. Añadir 600 μ l de la solución RLT, al cual se le ha añadido β -mercaptoetanol (10 μ L de β -mercaptoetanol por mililitro de RLT).
- 1.3. Homogenizar el tejido a través de una jeringuilla estéril con una aguja de unos 30G.
- 1.4. Añadir 600 μ l de etanol al 70% y mezclar por pipeteo.

2. Carga de la columna

- 2.1. Añadir 600 μ l de la mezcla a una columna RNeasy.
- 2.2. Centrifugar a $\geq 8.000g$ durante 15 seg.

- 2.3. Descartar el líquido que ha pasado a través de la columna.
- 2.4. Añadir los 600µl restantes de la mezcla a una columna RNeasy.
- 2.5. Centrifugar a $\geq 8.000g$ durante 15 seg.
- 2.6. Descartar el líquido que ha pasado a través de la columna.

3. Tratamiento con DNasa (adquirido a Qiagen, RNase-Free DNase Set)

- 3.1. Añadir 350µl de la solución RW1 a la columna.
- 3.2. Centrifugar a $\geq 8.000g$ durante 15 seg.
- 3.3. Descartar el líquido que ha pasado a través de la columna.
- 3.4. Añadir 80µl de la solución de DNasa (70µl de la solución RDD más 10µl de la solución de DNasa) directamente a la membrana de sílica gel.
- 3.5. Dejar actuar durante 15 min a temperatura ambiente.
- 3.6. Añadir 350µl de la solución RW1 a la columna.
- 3.7. Centrifugar a $\geq 8.000g$ durante 15 seg.
- 3.8. Descartar el líquido que ha pasado a través de la columna.

4. Lavado y elución

- 4.1. Añadir 500µl de la solución RPE a la columna.
- 4.2. Centrifugar a $\geq 8.000g$ durante 15 seg.
- 4.3. Descartar el líquido que ha pasado a través de la columna.
- 4.4. Añadir 500µl de la solución RPE a la columna.
- 4.5. Centrifugar a $\geq 8.000g$ durante 2 min.
- 4.6. Descartar el líquido que ha pasado a través de la columna.
- 4.7. Centrifugar a $\geq 8.000g$ durante 1 min.
- 4.8. Descartar el líquido que ha pasado a través de la columna.
- 4.9. Añadir 33µl de agua libre de RNasas directamente en la membrana de sílica gel.

4.10. Dejar 1 min a temperatura ambiente.

4.11. Cambiar el eppendorf receptor del eluyente.

4.12. Centrifugar a $\geq 8.000g$ durante 1 min.

1.2.- Quantificación del RNA

La valoración de la cantidad de RNA se hace por espectroscopia, valorando la absorbancia a 260 nm y calculándola a través de la fórmula de Beer-Lambert, en la que se establece la relación lineal entre la absorbancia y la concentración:

$$A = \varepsilon \times C \times I$$

Donde:

- A es la absorbancia a una longitud de onda.
- ε es el coeficiente de extinción (en el caso del RNA es de $0,025 \text{ (mg/ml)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y en el caso del DNA es de $0,020 \text{ (mg/ml)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).
- I es la longitud que atraviesa el haz. En el caso de las cubetas de cuarzo suele ser de 1 cm.
- C es la concentración de RNA.

Cabe comentar que para la realización correcta de la medida se deben utilizar cubetas de cuarzo o bien plásticos que no absorban en la longitud de onda de 260nm (región UV). Además, esta medida no discrimina entre RNA y DNA, con lo que si tenemos DNA contaminante no lo detectaremos y lo considerará como RNA.

Por último, comentar que ha aparecido una generación de nuevos espectrofotómetros (nanodrop, comercializado por Thermo Scientific), que tan sólo con $1\mu\text{l}$ de muestra se puede valorar su absorbancia y tiene un rango de trabajo de 2 a $3700\text{ng}/\mu\text{l}$.

1.3.- Determinación de la "pureza" del RNA

Una forma indirecta de observar la pureza del RNA es a través del ratio de las absorbancias de la muestra a 260 y 280 nm. Ratios de $\text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{280}$ iguales o superiores a 1.8 indican que estamos ante un RNA de calidad óptima.

Cabe comentar que esta medida no discrimina entre RNA y DNA, con lo que si tenemos DNA contaminante no lo detectaremos y lo considerará como RNA. Además, el pH de la solución en la que esté diluido el RNA puede hacer variar el ratio observado, obteniéndose ratios inferiores en soluciones ácidas (por ejemplo agua tratada con DEPC y pH 5-6) y superiores en soluciones alcalinas (por ejemplo solución de Tris [Tris(hidroximetil)aminometano] y EDTA (TE) a pH 8).

1.4.- Determinación de la integridad del RNA

Cuando se extrae el RNA de un material biológico es fundamental garantizar su calidad y podernos asegurar, de esta manera, que los resultados obtenidos en siguientes experimentos serán validos.

Cuando se extrae RNA total, como es el caso de los métodos descritos anteriormente, éstos son ricos en los RNA ribosómicos (RNAr), 18S y 28S. Cuando se observa el perfil del RNA total, para garantizar que éste tiene una calidad óptima, se deben observar dos bandas de mayor intensidad, correspondientes a los RNAr. Además, la banda de 28S (superior) debe ser el doble de intensa que la banda 18S (inferior).

Los métodos que se describen a continuación están basados en la electroforesis del RNA.

1.4.1.- Electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante

Todo el material tiene que haber sido tratado para crear un ambiente libre de RNasas. Se recomienda que los erlenmeyers y cubetas de electroforesis se destinen exclusivamente a geles de RNA.

Protocolo:

Preparación de un gel de agarosa desnaturalizante (para un gel pequeño de 50ml):

1. Añadir en un erlenmeyer:
 - 1.1. Agua libre de RNasas.....35ml
 - 1.2. Agarosa (Sigma).....0,55g
2. Calentar en un microondas hasta que la agarosa se funda

3. Añadir:

3.1. MOPS (tampón del ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico) 10x (Ambion) .5ml

3.2. Formaldehído al 30% (Sigma)..... 10ml

4. Dejar solidificar en la bandeja de polimerización, con un peine que forme los pocillos

5. Retirar los límites de la bandeja y situar la bandeja y el gel en una cubeta con tampón MOPS 1x

Preparación de las muestras:

1. Traspasar entre 3 y 5 µg de RNA a un eppendorf.

2. Añadir 15µl de tampón formaldehído de carga (Ambion).

3. Calentar la muestra 15 min a 65°C (proceso de desnaturalización).

4. Hacer una centrifugación rápida para bajar toda la muestra al fondo del eppendorf.

5. Enfriar en hielo.

6. Añadir 1µl de bromuro de etidio (Sigma).

Electroforesis de las muestras:

A continuación se carga la muestra en el gel y se somete a una carga de unos 50V, hasta que el frente avanza unos 5 cm.

Acto seguido se visualiza el resultado en una lámpara UV, debiéndose observar 2 bandas intensas. La más cercana a los pocillos (28S) debe ser más intensa que la más alejada (18S) (Fig. 12.A)

Si observamos:

1. Una banda unida a los pocillos, significa que el RNA está contaminado con DNA genómico.

2. Una banda continua (*smear*), a forma de escalera, significa que el RNA está degradado (Fig. 12.B).
3. Si se distinguen claramente las 2 bandas, pero la 18S es más intensa que la 28S, ha habido una degradación parcial (Fig. 12.C).
4. Si se observa una banda en el frente ha habido una degradación importante de la muestra (Fig. 12.B)

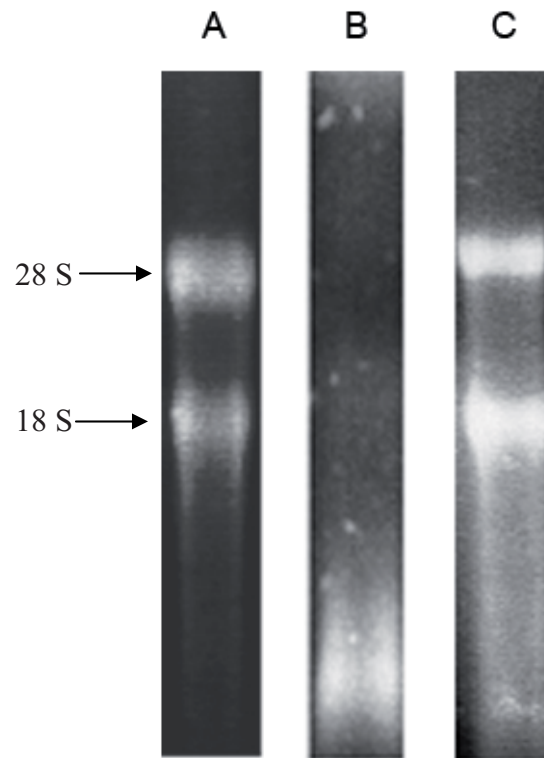


Fig. 12. RNA electroeluido en un gel de agarosa desnaturizante. **A.** Muestra íntegra. **B.** Muestra completamente degradada. **C.** Muestra parcialmente degradada.

1.4.2.- Electroforesis a través del aparato 2100 Bioanalyzer de Agilent

Este aparato sigue los mismos principios que la técnica anterior pero todo el proceso está automatizado.

El Bioanalyzer presenta toda una serie de ventajas:

1. Proceso completamente automatizado.
2. Precisión: Perfil completo del RNA por tamaño de fragmentos.
3. Rapidez: 10 muestras en 30 min.

4. Requerimiento de poca muestra: menos de 0,5 μ g y más de 0,02 μ g.

El único problema que presenta es que es más caro que la anterior técnica y se deben examinar 10 muestras simultáneamente.

Este aparato se basa en un *lab-on-a-chip*, es decir, una placa con diferentes canales rellenos de un gel que permite separar los RNAs por su tamaño a la vez que los marca fluorescentemente. Para procesar las muestras, éstas se cargan una vez desnaturalizadas y por un proceso de electroforesis avanzan por los canales, de forma que el RNA que contiene la muestra se separa por su tamaño y se marca. Al final del canal, hay un lector de fluorescencia que transforma las señales en una imagen similar a un gel y realiza un electroferograma (Fig. 13).

Esta prueba es imprescindible para garantizar la integridad del RNA en procesos como microarrays de RNA y en un futuro próximo desbancará la anterior técnica.

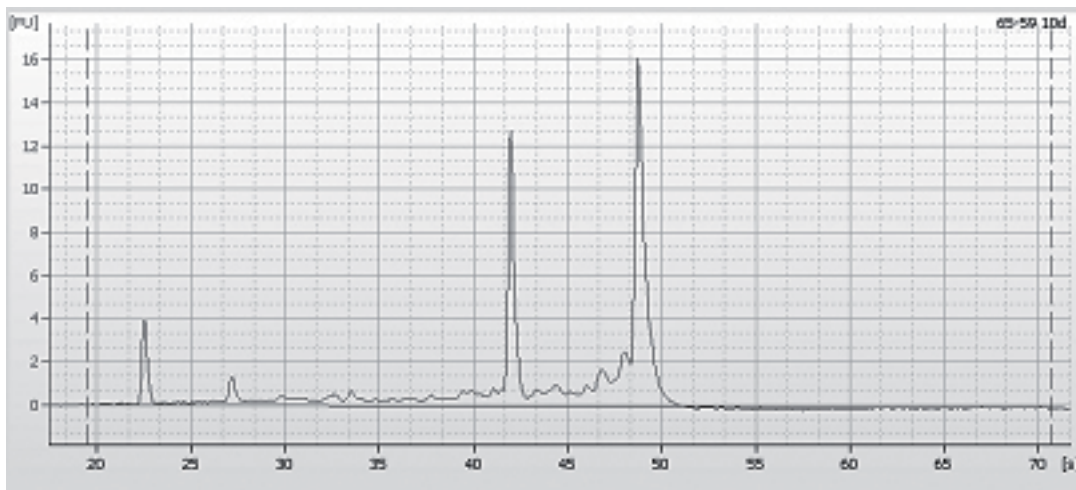


Fig. 13. Electroferograma de una muestra de islotes de rata. En el eje de las abscisas se representa el tiempo que tarda en salir la muestra en segundos. En el eje de las ordenadas se representa a intensidad de fluorescencia detectada. Esta es una muestra con una elevada integridad en la que el pico del RNA ribosómico 28S (sobre los 49 segundos) tiene un área que duplica al pico del RNA ribosómico 18S (sobre los 42 segundos).

1.5.- Eliminación del DNA en las muestras de RNA

Básicamente consiste en el tratamiento del RNA con Deoxyribonucleasa I (DNAsal). Todos los reactivos vienen juntos al adquirir la DNAsal a Invitrogen.

Protocolo:

1. Añadir a un eppendorf libre de RNAsas:
 - 1.1. RNA cantidad suficiente para (c.s.p.) 2µg
 - 1.2. Tampón de reacción de la DNasaI 1µl
 - 1.3. DNasa I (1U/µl) 1µl
 - 1.4. Agua libre de RNAsas c.s.p. 10µl
2. Dejar 15 min a temperatura ambiente.
3. Añadir 1µl de EDTA 25mM, para quelar los cationes Mg^{2+} y Ca^{2+} , de forma que la DNasa quede inactivada temporalmente.
4. Calentar la muestra a 65°C durante 10min para desnaturalizar e inactivar definitivamente la DNasa.

2.- RETROTRANSCRIPCIONES, CLONACIONES, PCRs

Los procesos de amplificaciones y retrotranscripciones son procesos delicados, en los que las contaminaciones de materiales biológicos externos a nuestra muestra son frecuentes. Por ello, se deben mantener unas ciertas normas básicas:

1. Uso de un espacio exclusivo para realizar estos experimentos.
2. Uso de material exclusivo para realizar estos experimentos (pipetas, eppendorfs, etc.).
3. Uso siempre de guantes.
4. Limpieza del material con DNAZap (Ambion), utilizando primero la solución 1, luego la solución 2 sobre la 1, dejando actuar los productos durante 1 minuto y recogiendo el exceso con un papel. A continuación se limpia el material con agua y se deja secar.

2.1.- Retrotranscripción del RNA a cDNA

Principalmente se utilizaron las retrotranscriptasas de Invitrogen, SuperScript II y III. Como norma general, para realizar estudios de PCR a tiempo real se utilizó la SuperScript III y para otras aplicaciones la SuperScript II.

La principal diferencia entre ambas retrotranscriptasas es (a parte del precio) la temperatura a la que trabajan, siendo superior en el caso de la SuperScript III, lo que permite que el RNA pierda en mayor medida su conformación y sea más sencillo retrotranscribir ciertos transcritos que de otra manera no se retrotranscribirían o se retrotranscribirían en menor medida.

Protocolo (SuperScript II):

Todos los productos fueron adquiridos a Invitrogen.

1. Añadir en un eppendorf:
 - 1.1. Random primers (cebadores aleatorios).....c.s.p. 250ng
 - 1.2. RNA.....c.s.p. 1ng a 5µg

- 1.3. Mezcla de dNTPs (deoxinucleótidos trifosfatos) a 10mM 1µl
- 1.4. Agua libre de RNasas c.s.p. 12µl
2. Calentar el eppendorf a 65°C durante 5 min.
3. Enfriar el eppendorf en hielo.
4. Centrifugar brevemente el eppendorf para bajar todo el contenido a la parte inferior del eppendorf.
5. Añadir:
 - 5.1. Tampón de primera cadena (first strand buffer) (5x) 4µl
 - 5.2. DTT (ditiotreitól) 0,1M 2µl
 - 5.3. RNaseOUT (40U/µl) 1µl
6. Mezclar golpeando suavemente el eppendorf.
7. Calentar el eppendorf a 25°C durante 2 min.
8. Añadir SuperScript II (200U/µl) 1µl
9. Incubar en un termociclador a:
 - 9.1. 25°C durante 10min (unión de los primers).
 - 9.2. 42°C durante 50min (elongación).
 - 9.3. 70°C durante 15min (inactivación).
 - 9.4. 4°C hasta la retirada del eppendorf.

Protocolo (SuperScript III):

Todos los productos fueron adquiridos a Invitrogen.

1. Añadir en un eppendorf:
 - 1.1. Random primers (cebadores aleatorios)..... c.s.p. 250ng
 - 1.2. RNA c.s.p. 10pg a 5µg
 - 1.3. Mezcla de dNTPs a 10mM 1µl
 - 1.4. Agua libre de RNasas c.s.p. 13µl

2. Calentar el eppendorf a 65°C durante 5 min.
3. Enfriar el eppendorf en hielo.
4. Centrifugar brevemente el eppendorf para bajar todo el contenido a la parte inferior del eppendorf.
5. Añadir:
 - 5.1. Tampón de primera cadena (first strand buffer) (5x)4µl
 - 5.2. DTT (ditiotreitól) 0,1M1µl
 - 5.3. RNaseOUT (40U/µl)1µl
 - 5.4. Añadir SuperScript III (200U/µl)1µl
6. Mezclar golpeando suavemente el eppendorf.
7. Incubar en un termociclador a:
 - 7.1. 25°C durante 5min (alineamiento).
 - 7.2. 50°C durante 60min (elongación).
 - 7.3. 70°C durante 15min (inactivación).
 - 7.4. 4°C hasta la retirada del eppendorf.

2.2.- Amplificaciones

2.2.1.- Amplificaciones convencionales

Las PCR (*polymerase chain reaction*, reacción en cadena de la polimerasa) convencionales, es decir, sin realizar un seguimiento ciclo a ciclo (tal como se realiza en las PCRs a tiempo real) se utilizaron para: comprobar que el inserto de los adenovirus era correcto, estudios de expresión de genes en diferentes líneas celulares, puestas a punto de las condiciones de la PCR, etc. En definitiva, como norma general se han empleado para la comprobación o puesta a punto de alguna técnica. Por esta razón, en este apartado no se describe detalladamente cada PCR convencional realizada, si no una PCR general que debe ser adaptada a cada PCR.

Protocolo:

1. Añadir a un eppendorf:
 - 1.1. Mezcla de dNTPs a 10mM (GeneCraft)1µl
 - 1.2. Mezcla de cebadores a 10µM2µl
 - 1.3. Tampón de reacción Taq polimerasa10x2,5µl
 - 1.4. MgCl₂ (50mM)0,75µl (1,5mM)
 - 1.5. cDNA2µl
 - 1.6. Taq polimerasa (GeneCraft)0,5µl
 - 1.7. Aguac.s.p. 25µl
2. Mezclar con la pipeta.
3. Centrifugada breve para bajar el contenido.
4. Introducir en el termociclador con estas condiciones:
 - 94°C-----5min
 - 30-35 ciclos de:
 - 94°C-----1min (fase de desnaturalización)
 - 55-65°C-----1min (fase de alineamiento)
 - 72°C-----1min (la fase de extensión depende de la longitud del transcrito, como norma general 1Kb/1min)
 - 72°C-----5min
 - 4°C-----∞

2.2.2.- Amplificaciones a tiempo real

La técnica de PCR a tiempo real nos permite observar como se amplifican los transcritos ciclo a ciclo. Existen varias formas de hacer este seguimiento basadas en diferentes fluoróforos y cebadores, aunque en nuestro caso sólo utilizamos el fluoróforo SYBRgreen. Éste se une a cadena de DNA doble, de forma que cuanto más transcrito tengamos, mayor fluorescencia se observará.

Cuando se ha pasado un cierto límite de fluorescencia (threshold), consideramos que a partir de ese momento el gen comienza a estar presente. Se define el ciclo en el que eso sucede como la Ct (*threshold cycle*, ciclo lindar) de nuestra muestra para el gen que se está amplificando. Para establecer el punto de corte en el que consideramos que un gen está presente existen varias metodologías. En nuestro caso, se calculó automáticamente con el algoritmo que viene por defecto en el programa SDSv2.3 (*Sequence Detection System version 2.3*, sistema de detección de secuencias versión 2.3 de Applied Biosystems) y se basa en seleccionar un punto lo suficientemente elevado para distinguirse del ruido de fondo y lo suficientemente bajo como para no llegar al límite de saturación, encontrándose además en la fase exponencial de la señal. Un ejemplo lo podemos encontrar en la Fig. 14.

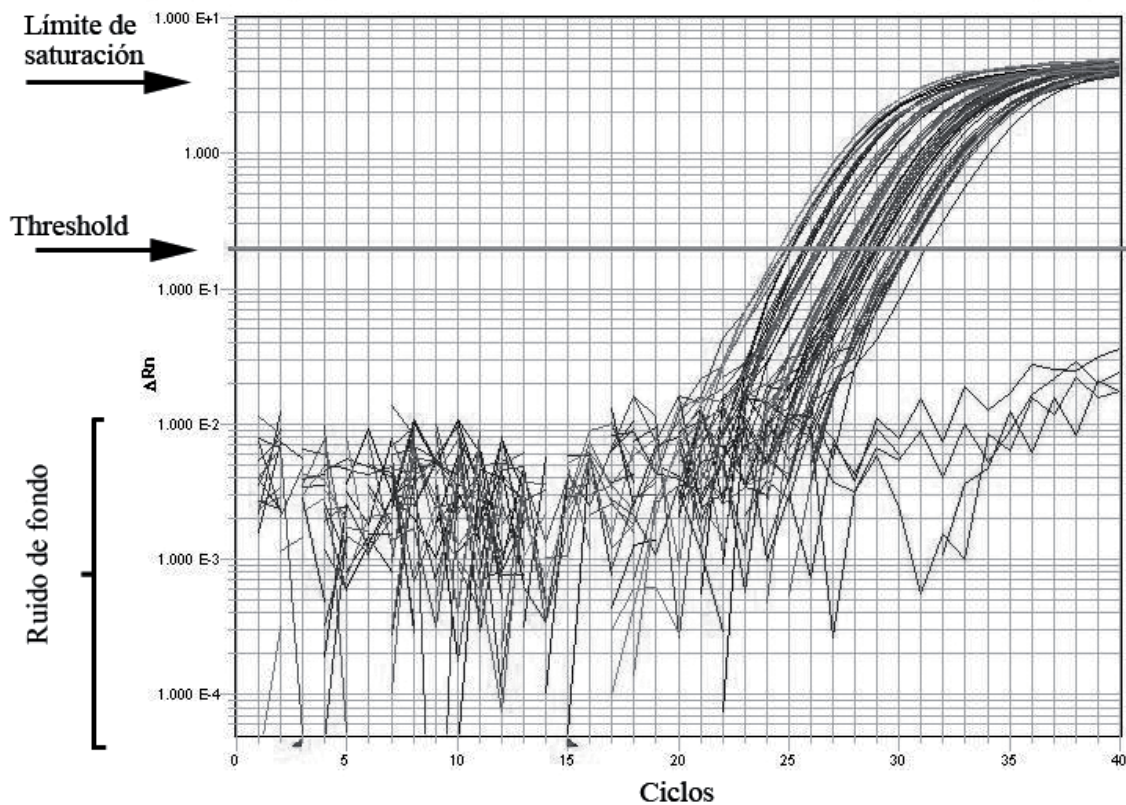


Fig. 14. Ejemplo de amplificación del gen de la CDK6 (*cyclin dependent kinase 6*, ciclina dependiente de quinasa 6) en islotes humanos. En el eje Y se representa la fluorescencia, mientras que en el eje X se representan los ciclos del termociclador. En la imagen se pueden distinguir la zona de ruido de fondo, la zona de saturación de la señal y el punto de corte escogido (threshold).

La cuantificación de los resultados se puede realizar principalmente de dos formas, habiéndose utilizado para este trabajo la metodología de cuantificación relativa por curva estándar. Ésta se basa en tener una muestra control y proceder a hacer una batería de diluciones de esta muestra, otorgando unos valores relativos a cada dilución, de forma que sepamos cuantos ciclos tienen que pasar para que la cantidad del gen que se esté analizando se duplique. La figura 15 muestra un ejemplo de curva estándar.

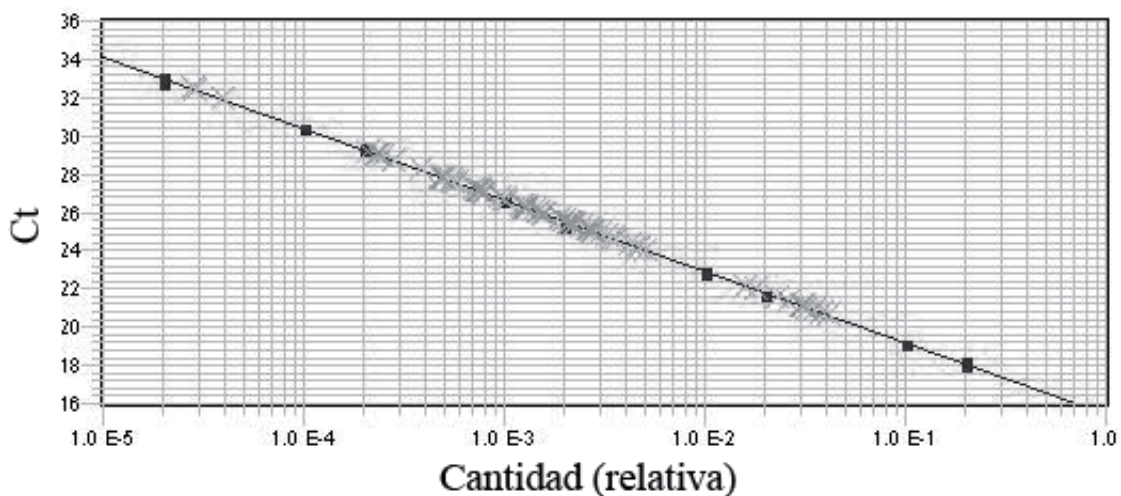


Fig. 15. Ejemplo de curva estándar para PCR a tiempo real. En el eje de las Y se muestra la Ct para cada muestra y en el eje de las X se muestra el valor dado a cada punto de curva estándar. Las diferentes diluciones que forman la curva se muestran en forma de cuadrados y las muestras a analizar se muestran en forma de cruces.

Así, por ejemplo, en el trabajo realizado sobre *Tmem27* en islotes humanos, se valoró por el espectrofotómetro el cDNA obtenido de una muestra de islotes humanos control y se realizó una batería de diluciones de esta muestra, de forma que en los pocillos de la curva estándar se ponía desde 0,5 μ g hasta 0,01 μ g de cDNA por pocillo (este rango se podía ampliar siempre y cuando se mantuviera la linealidad y no se llegara a diluir tanto la muestra control que no se amplificase). En los pocillos de las muestras a analizar se añadía 0,1 μ g de cDNA de la muestra problema.

Por otro lado, se analizó la expresión de un gen (*housekeeping gene*, gen control) que se supone se expresa de forma homogénea en los diferentes tejidos analizados. En

nuestro caso tomamos como gen control a *Tbp* (*TATA box binding protein*, proteína de unión a la caja TATA). Este gen permite normalizar los resultados entre las diferentes muestras, ya que aunque hayamos puesto la misma cantidad de cDNA, no siempre las amplificaciones se producen igual. Así, el valor del gen que estudiamos se expresa como el ratio entre el valor del gen que estudiamos respecto el valor del gen control.

Protocolo:

1. Añadir a una placa de 96 pocillos para PCR a tiempo real (Applied Biosystems) (cantidades por pocillo):
 - 1.1. SYBRGreen Master Mix 2x (Applied Biosystems)..... 10 μ l
 - 1.2. Mezcla de cebadores a 10 μ M 0,5 μ l
 - 1.3. cDNA..... 2 μ l
 - 1.4. Agua..... 7,5 μ l
2. Centrifugada breve para bajar el contenido.
3. Introducir en el termociclador 7900HT (Applied Biosystems) con las condiciones predeterminadas:
 - 50°C-----2min
 - 5°C-----10min
 - 40 ciclos de:
 - 95°C-----15seg (fase de desnaturalización)
 - 60°C-----1min (fase de alineamiento y extensión)
 - 95°C-----15seg
 - Incremento de 60°C a 95°C a una velocidad de unos 1,92°C/min (fase de curva de disociación)

Cabe comentar que esta técnica mide la fluorescencia total de las cadenas dobles de DNA unidas a SYBRgreen. Ello provoca que, si aparecen varios transcritos, la fluorescencia observada será el total de todos los transcritos, no pudiendo distinguir el transcrito específico del gen que se examina. Para solventarlo, se realiza en el último paso un incremento lento de la temperatura de la muestra, de forma que llega un momento en el que las hebras dobles de DNA se separan. Teniendo en cuenta que el fluoróforo SYBRgreen sólo se une a cadenas de DNA dobles, en el momento en el que se abren las hebras de DNA se produce un pico de fluorescencia. Si se observan varios picos significará que han aparecido varios transcritos, de manera que los cebadores utilizados no son adecuados y deben diseñarse de nuevos. Un ejemplo se puede observar en la Fig. 16.

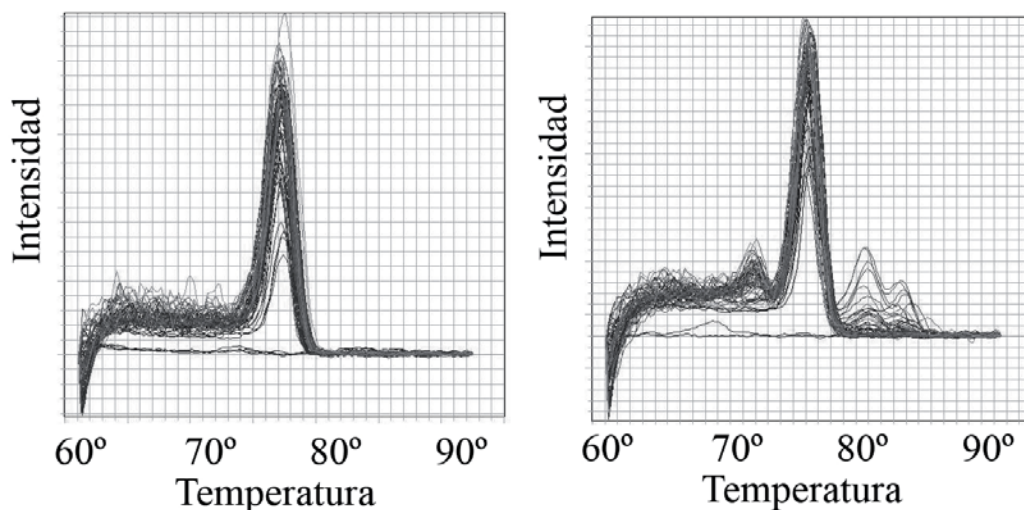


Fig. 16. Ejemplos de curvas de disociación. Curva de disociación obtenida para unos cebadores que dan lugar un transcrito (panel izquierdo) y para otros cebadores que dan lugar a varios transcritos (panel derecho)

Por último, comentar que los cebadores fueron diseñados con el programa *Primer Express* de Applied Biosystems, con los parámetros predeterminados para cebadores y sondas Taqman, pero sin tener en cuenta las sondas Taqman. Entre las diferentes opciones dadas para cada gen, se escogió aquella que tuviera una puntuación superior, y siempre que fue posible, se escogieron aquellos cebadores que estaban en dos exones diferentes.

CEBADORES UTILIZADOS

Cebadores utilizados en cDNA humano:

1. *INSULINA* (NM_000207)

Forward (hacia adelante): GCAGCCTTTGTGAACCAACA

Reverse (reverso): TTCCCCGCACACTAGGTAGAGA

2. *TMEM27 (TRANSMEMBRANA 27)* (NM_020665)

Forward: GAAAGAATGTTGTGGCTGCTCTT

Reverse: TTTTCTGCACCTGGTTGACAGA

3. *TBP (TATA BOX BINDING PROTEIN, PROTEÍNA DE UNIÓN A LA CAJA TATA)* (NM_003194)

Forward: GCCCGAAACGCCGAATAT

Reverse: CGTGGCTCTCTTATCCTCATGA

4. *AMILASA, ALFA 2A* (NM_000699)

Forward: CAATGACTGGGTCTGTGAACATC

Reverse: AGGCTGGCCATCCACTACAT

5. *ESNAPINA* (NM_012437)

Forward: CTGTGCAGCAGCTCGACTCT

Reverse: CAATTTGTTCCCGGAGCTCTAC

6. *CICLINA E1* (NM_057182)

Forward: TGCAGAGCTGTTGGATCTCTGT

Reverse: GCCGAAGCAGCAAGTATACCA

7. *CDK2 (CYCLIN-DEPENDENT KINASE 2, QUINASA DEPENDIENTE DE CICLINA 2)* (NM_001798)

Forward: CTCCCCTGGATGAAGATGGA

Reverse: GGCCGAAATCCGCTTGTTA

8. *CICLINA D1* (NM_053056)

Forward: CACGCGCAGACCTTCGTT

Reverse: CCGCTGCCACCATGGA

9. *CDK6 (CYCLIN-DEPENDENT KINASE 6, QUINASA DEPENDIENTE DE CICLINA 6)* (NM_001259)

Forward: TGCCCGCATCTATAGTTTCCA

Reverse: GACTTCGGGTGCTCTGTACCA

Cebadores utilizados en cDNA de rata:

1. *Tmem27 (Transmembrana 27)* (NM_020976)

Forward: ATGAGAAAAGTTCCCAACAGAGAAG

Reverse: ACCAAAATGACACTCTCGGGTTAC

2. *Insulina 2* (NM_019130)

Forward: TTGTGGTTCTCACTTGGTGGAA

Reverse: CACTTGTGGGTCCTCCACTTC

3. *Tbp (TATA box binding protein, proteína de union a la caja TATA)* (NM_001004198)

Forward: TGCACAGGAGCCAAGAGTGA

Reverse: AGCCCAGCTTCTGCACAACT

4. *Tgfb3 (Transforming growth factor, beta 3, factor de crecimiento de transformación beta 3)* (NM_013174)

Forward: CAGGCCCTTGCCCTTACC

Reverse: TCAGGGTGTGTATAGTCCAAGCA

5. *Fgf13 (Fibroblast growth factor 13, factor de crecimiento de fibroblastos 13)* (NM_053428)

Forward: TCTCCCGATCCGGAAGTG

Reverse: GGATTTGCCTCCATTCAGTACAC

6. *Xbp1* (*X-box binding protein 1, proteína de unión a la caja X 1*) (NM_001004210)

Forward: TCCTGGGAGGACACTTTTGC

Reverse: TGGTGGGTGGCTTTAGACT

7. *Usag-1* (*Uterine sensitization-associated gene-1, gen asociado a la sensibilización uterina 1*) (NM_153737)

Forward: AGCCCGGTGGCATTTC

Reverse: GCTGGCATTCCACTCCAAGA

8. *Tspan8* (*Tetraspanina 8*) (NM_133526)

Forward: TGCAGTTGGGTCCATCATCA

Reverse: AGCATGCAGCGACTTTCTTTC

9. *Sel1h* (*Suppressor of lin-12-like, similar al supresor de lin-12*) (NM_177933)

Forward: TTGATGTAGGGCTCTGGATGGT

Reverse: TCTAAGCAGCTTCTGGGATTCAAC

10. *Rkip* (*Raf kinase inhibitor protein, proteína inhibidora de la quinasa Raf*) (NM_017236)

Forward: ACTTCCTGGTGGTCAACATGAA

Reverse: TCCGAGCCACGTATTC

11. *Amilasa* (NM_031502)

Forward: CATTTTCCAAGAGGTCATTGATCTT

Reverse: TCACGCGGCCATTTC

12. *Nupr1* (*Nuclear protein 1, proteína nuclear 1*) (NM_053611)

Forward: GCCTGGCGCTGAGACAGA

Reverse: CCAAGTCCTGTATCCATTGCT

2.2.3.- Amplificaciones para clonaciones de genes

Para proceder a la amplificación y posterior clonación de los diferentes genes se utilizaron 2 protocolos:

2.2.3.1.- Advantage-GC cDNA PCR Kit

Este es un kit distribuido por Clontech, llamado Advantage-GC cDNA PCR Kit y se basa en la capacidad que tiene el reactivo GC melt en desestructurar las hebras de DNA y permitir el paso de las polimerasas. Sus principales ventajas son:

1. Las amplificaciones de los genes no requieren generalmente una puesta a punto de las condiciones.
2. Se suele obtener una única banda intensa y específica.
3. Se pueden amplificar transcritos ricos en guaninas y citosinas (GC), que de otra manera no se podrían amplificar.

La principal desventaja de este kit es que, aunque lleve una mezcla de 2 polimerasas y una de ellas sea *proofreading* (de alta fidelidad), a la práctica, en ocasiones, se introducen mutaciones y se debe secuenciar el transcrito para estar completamente seguro que no se ha introducido ningún error. Cabe comentar que este kit ya no se comercializa y se ha substituido por el kit Advantage GC 2 Polymerase Mix and PCR Kit, que lleva una nueva mezcla de polimerasas.

Protocolo

1. Añadir en un eppendorf libre de RNasas y DNasas:
 - 1.1. Mezcla de dNTPs a 50X1µl
 - 1.2. Mezcla de cebadores a 10µM2µl
 - 1.3. Tampón de reacción de GC cDNA PCR 10x5µl
 - 1.4. GC melt 10µM10µl
 - 1.5. DMSO (dimetilsulfóxido)2,5µl
 - 1.6. cDNA2µl
 - 1.7. Advantage-GC cDNA Polimerasa mix 50x1 µl

- 1.8. Agua.....26,5µl
2. Mezclar con la pipeta.
3. Centrifugada breve para bajar el contenido.
4. Introducir en el termociclador con estas condiciones:
 - 94°C-----5min
 - 30-35 ciclos de:
 - 94°-----1min
 - 55°C-----1min
 - 68°C-----1min (la fase de extensión depende de la longitud del transcrito, como norma general 1Kb/1min)
 - 68°C-----10min
 - 4°C-----∞

2.2.3.2.- Expand High Fidelity PCR System

Este kit está distribuido por Roche y se basa en una mezcla de polimerasas, siendo una de ellas *proofreading*, de forma que nos aseguramos que el transcrito amplificado no contenga mutaciones. A diferencia del anterior kit, requiere poner a punto las condiciones del termociclador y no todos los transcritos son amplificados, pero cuando se amplifican no contienen ninguna mutación.

Protocolo:

1. Añadir en un eppendorf libre de RNasas y DNasas:
 - 1.1. Mezcla de dNTPs a 10mM 1µl
 - 1.2. Mezcla de cebadores a 10µM 2µl
 - 1.3. Tampón de reacción de High Fidelity con MgCl₂ 15mM 10x 5µl
 - 1.4. cDNA 2µl
 - 1.5. Expand High Fidelity enzyme mix.....0,75µl (2,6U)

- 1.6. Agua.....39,25µl
2. Mezclar con la pipeta.
 3. Centrifugada breve para bajar el contenido.
 4. Introducir en el termociclador con estas condiciones:
 - 94°C-----2min
 - 10 ciclos de:
 - 94°-----15seg
 - 55°C-----30seg
 - 72°C-----1min (la fase de extensión depende de la longitud del transcrito, como norma general 1Kb/1min)
 - 25 ciclos de:
 - 94°-----15seg
 - 55°C-----30seg
 - 72°C-----1min + 5 seg por cada ciclo
 - 72°C-----7min
 - 4°C-----∞

2.2.3.- Amplificaciones para secuenciación

Para comprobar que las amplificaciones que hemos realizado no contienen mutaciones se procedió a su secuenciación a través del kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit, comercializado por Applied Biosystems.

Protocolo:

1. Añadir en un eppendorf:
 - 1.1. Muestra de DNA c.s.p. 0,5µg
 - 1.2. Terminator ready reaction mix 2µl

- 1.3. H₂O c.s.p. 10µl
2. Mezclar con la pipeta.
3. Centrifugada breve para bajar el contenido.
4. Introducir en el termociclador con estas condiciones:
 - 96°C-----5min
 - 25 ciclos de:
 - 96°-----10seg
 - 50°C-----5seg
 - 60°C-----4min
 - 60°C-----5min
 - 4°C-----∞

Las muestras se llevaron al secuenciador ubicado en el Parc Científic de Barcelona.

2.3.- Geles de agarosa

2.3.1.- Separación de fragmentos de DNA en agarosa

Los geles de agarosa permiten separar los fragmentos de RNA o DNA según su tamaño.

En función del porcentaje de agarosa que contengan, las bandas migrarán más o menos rápido. Así, un gel con un porcentaje elevado de agarosa (3%) se utiliza para observar bandas de un peso inferior a los 200pb, mientras que un gel con un porcentaje bajo de agarosa (0,5%) se utiliza para observar bandas de tamaño superiores a 1 Kb.

De rutina, excepto para ciertos casos concretos, se suele utilizar el gel al 1%, ya que es bastante claro a la hora de observarlo en el transiluminador (mayor porcentaje, mayor opacidad), es robusto (no se rompe con facilidad) y suele permitir una buena observación de las bandas a observar.

Preparación de un gel de agarosa (para un gel pequeño de 50ml al 1%):

1. Añadir en un erlenmeyer:
 - 1.1. Solución TAE (Tris, acético y EDTA) 50x 10ml
 - 1.2. H₂O destilada..... 40ml
 - 1.3. Agarosa (Sigma)..... 0,5g
2. Calentar en un microondas hasta que la agarosa se funda.
3. Una vez se haya enfriado razonablemente, pero sin que haya polimerizado el gel, añadir 2µl de bromuro de etidio (Sigma) y remover hasta su completa disolución.
4. Traspasar a una bandeja de polimerización y dejar solidificar, con un peine que forme los pocillos.
5. Retirar los límites de la bandeja y situar la bandeja y el gel en una cubeta con tampón TAE1x.

Preparación de las muestras:

1. Traspasar la muestra a un eppendorf (lo mismo se debe hacer con el peso molecular (Promega), que nos permite tener una referencia del peso de las bandas observadas).
2. Si la muestra tiene menos de 15µl, añadir agua c.s.p. 15µl.
3. Añadir tampón de carga azul/naranja 6x (*blue/orange loading dye* 6x) (Promega) 3µl.
4. Pipetear para homogenizar.
5. Hacer una rápida centrifugada para bajar toda la muestra al fondo del eppendorf.

A continuación se carga la muestra en el gel y se somete a una potencia de unos 80V, hasta que el frente avanza lo suficiente como para distinguir la banda de interés.

Reactivos:

- **Tampón TAE 50x**

1. Tris(hidroximetil)aminometano (Serva) 242g
2. Ácido acético glacial (Panreac) 57,1ml

3. Na₂EDTA.2H₂O (Sigma) 37,2g
4. H₂O destilada c.s.p. 1L

2.3.2.- Purificación de bandas en geles de agarosa

Una vez se ha realizado la clonación de un gen o la digestión de un vector, puede interesar aislarlo. Para ello, se corre dentro de un gel de agarosa junto con un marcador de peso. Con la ayuda de un transiluminador y un escalpelo se extrae la banda que corresponda a la muestra que queremos aislar. Para eliminar la agarosa y que rodea a la muestra se utiliza el kit QIAquick Gel Extraction Kit, comercializado por Qiagen y basado en el sistema de columnas que contienen resinas de sílica-gel, en las que se une el DNA de 70pb a 10Kb.

Protocolo:

1. Introducir la muestra en un eppendorf y pesar la muestra. El peso máximo que puede procesar una columna es de 400mg de agarosa.
2. Añadir al eppendorf el tampón QG en un cantidad 3 veces superior al peso (por ejemplo, peso de la muestra 100mg, cantidad de tampón 300µl).
3. Calentar la muestra a 50°C durante 10min o hasta que la muestra de agarosa se funda, agitando el eppendorf cada 2-3min.
4. Añadir 1 volumen de isopropanol (por ejemplo, peso de la muestra 100mg, cantidad de isopropanol 100µl) y homogenizar pipeteando.
5. Traspasar el contenido del eppendorf a una columna QIAquick (volumen máximo de 800µl; en caso de superarlo, realizar el paso 5 y 6 dos veces).
6. Centrifugar a máximas revoluciones (20.000g, por ejemplo en una centrifuga refrigerada Eppendorf 5417R) durante 1 min.
7. Descartar el líquido que ha pasado a través de la columna.
8. Añadir a la columna 0,75ml de tampón PE y dejarlo entre 2 y 5 min.
9. Centrifugar a máximas revoluciones durante 1 min.
10. Descartar el líquido que ha pasado a través de la columna.

11. Centrifugar a máximas revoluciones durante 1 min.
12. Descartar el posible líquido que haya podido pasar a través de la columna y cambiar el eppendorf receptor del eluyente.
13. Añadir 30 μ l de tampón de elución en el centro de la membrana y dejarlo durante 1 min.
14. Centrifugar a máximas revoluciones durante 1 min.
15. Recoger eluyente.
16. Valorar concentración del eluyente por espectrofotometría .

3.- VECTORES

Los vectores o plásmidos nos permiten sobreexpresar o silenciar genes, crear adenovirus, lentivirus, etc.

Aquí se describen algunas de las técnicas utilizadas para la formación de los vectores finales.

3.1.- Digestión de vectores

A través del mapa del vector o plásmido, se deben localizar los lugares donde los enzimas de restricción actúan, localizando aquellos lugares que nos permiten liberar los fragmentos de interés o abrir el plásmido por un lugar determinado.

Los enzimas de restricción se adquirieron a New England Biolabs y van acompañados de los reactivos necesarios para proceder a la digestión (tampón y BSA (*bovine serum albumine*, albúmina de suero bovino) en caso necesario).

Cuando se realizan digestiones múltiples, se debe observar la compatibilidad de los enzimas de digestión en los diferentes tampones (accesible desde la página web de New England Biolabs), eligiendo el tampón que dé un mayor rendimiento en todos los enzimas. Además, la temperatura a la que trabajan ambas enzimas debe ser también compatible.

Si los enzimas fueran completamente incompatibles, se deberá realizar la digestión de forma secuencial, de forma que primero se realice una digestión, se purifique el plásmido (por columnas o por precipitación) y a continuación se proceda a la siguiente digestión.

Otros aspectos a tener en cuenta a la hora de seleccionar el enzima de restricción es la posibilidad que éste tenga *star activity* (actividad estrella), consistente en que algunas condiciones pueda reconocer secuencias diferentes a las predeterminadas, o que sea inhibido por la presencia de grupos metil en regiones cercanas al punto de corte (grupos introducidos por las metiltransferasas presentes en algunas de las cepas bacterianas que amplifican los vectores).

Protocolo (orientativo):

1. Añadir en un eppendorf:
 - 1.1. Plásmido que queramos digerir c.s.p. 1-2µg
 - 1.2. Tampón 10x..... 2µl
 - 1.3. BSA (si fuera necesaria) 10x 2µl
 - 1.4. Enzima de digestión 1µl
 - 1.5. H₂O destilada..... c.s.p. 20µl
2. Calentar la muestra a la temperatura de trabajo del enzima durante un mínimo de 2 horas (se puede dejar toda la noche si no tiene *star activity*).

3.2.- Desfosforilación de vectores

Una vez los vectores han sido abiertos para la introducción de un fragmento en su interior, éstos se deben desfosforilar para evitar que el vector se vuelva a cerrar sin incorporar el nuevo fragmento en el proceso de ligación.

Para desfosforilarlo se utilizó la *Antartic Phosphatase* (fosfatasa antártica) de New England Biolabs.

Protocolo:

1. Añadir a un eppendorf:
 - 1.1. Vector cortado y purificado c.s.p. ligación
 - 1.2. Tampón de desfosforilación 10x 2µl
 - 1.3. Antartic Phosphatase (5 U) 1µl
2. Calentar el eppendorf a 37°C 15 min. si los extremos que se han formado son protuberantes en 5'
3. Calentar el eppendorf a 37°C 60 min. si los extremos que se han formado son romos o protuberantes en 3'.
4. Calentar el eppendorf a 65°C 5 min para inactivar la fosfatasa.

3.3.- Ligación de fragmentos

Tras abrir el vector y tener el fragmento (inserto) que queremos introducir dentro del vector, se procede a la ligación de ambos.

Para saber la cantidad de vector y de fragmento que vamos a necesitar aplicamos las siguientes fórmulas:

$$F = \frac{\text{inserto}(pb)}{\text{vector}(pb)} \times T$$

$$\text{Vector}(ng) = \frac{200}{1 + F}$$

$$\text{Inserto}(ng) = 200 - \text{Vector}(ng)$$

Donde T es igual a 3 en caso de extremos cohesivos, o igual a 2 en caso de extremos romos.

La cantidad de vector obtenida en la fórmula es la cantidad de vector que se desfosforila y que está en un volumen final de 20µl.

Los reactivos se adquirieron a Invitrogen. Cabe comentar que el tampón de ligación contiene ATP (adenosil trifosfato), siendo sensible a la congelación-descongelación, con lo que se recomienda alicuotar la primera vez que se descongele. Además, la cantidad de ligasa que se utiliza en este protocolo es superior a la recomendada, pero debido a la dificultad que a veces presentan las ligaciones se decidió trabajar con un exceso.

Protocolo:

1. Añadir a un eppendorf:

- 1.1. Vector cortado, purificado y desfosforilado 20µl
- 1.2. Inserto cortado y purificado c.s.p. ligación
- 1.3. Tampón de ligación 5x 6µl
- 1.4. T4 DNA ligasa (5 U) 1µl

- 1.5. H₂O c.s.p. 30µl
2. Dejar el eppendorf a temperatura ambiente unas 12h (toda la noche).

3.4.- Clonación de fragmentos de PCR

Para la clonación de fragmentos de PCR se utilizó el kit pGEM-T Easy Vector Systems de Promega, que permite aprovechar las características de los fragmentos de PCR que presentan extremos protuberantes 3' con una adenina. Teóricamente, con el kit de *Roche Expand High Fidelity PCR System* los fragmentos obtenidos no deberían presentar extremos protuberantes debido a la actividad *proofreading* de una de las polimerasas que lleva (*Tgo* polimerasa), pero a la práctica estos fragmentos también son clonados sin necesidad de añadir adeninas en 3'.

Este kit lleva un vector, el pGEM-T Easy, que está abierto y presenta extremos protuberantes 3' con una timidina, hecho que impide (en parte) su recirculación y que permite la ligación del fragmento que se quiera clonar, siempre y cuando disponga de extremos protuberantes 3' con una adenina. Además, debido a que en el lugar en el que está abierto es en medio del gen *LacZ* que codifica para la β-galactosidasa, cuando se clona satisfactoriamente un gen, se crea un gen aberrante *LacZ* y no se produce la expresión de una β-galactosidasa funcional (siempre y cuando el fragmento sea lo suficientemente largo y/o no entre in-frame [no entre de forma que el código de lectura para la translación se mantenga]), de forma que valorando la actividad β-galactosidasa podemos saber por adelantado si se ha insertado algo en el vector o no.

Protocolo:

1. Añadir a un eppendorf:
- 1.1. Vector pGEMT-easy 0,5µl
- 1.2. Inserto cortado y purificado c.s.p. ligación
- 1.3. Tampón de ligación rápida 2x 5µl
- 1.4. T4 DNA ligasa 1µl (3U)
- 1.5. H₂O c.s.p. 10µl

2. Dejar el eppendorf a 16°C unas 12h (toda la noche), para ligaciones que hayan fracasado anteriormente o a temperatura ambiente 1h.

4.- BACTERIAS

4.1.- Transformación de bacterias competentes

Para amplificar los vectores se han utilizado bacterias competentes *E. coli* DH-5 α . Se ha de tener en cuenta que deben conservarse a -80°C alicuotadas y su descongelación y congelación o cambios de temperatura en el ultracongelador hacen que pierdan su capacidad de ser transformadas.

Protocolo:

1. Descongelar en hielo una alícuota de bacterias DH-5 α (50 μ l) (Invitrogen).
2. Cercas de una llama, añadir el vector ligado o que se quiera amplificar (en caso de las ligaciones, la mitad del volumen de la ligación).
3. Dejar 30 min a 4°C.
4. Calentar el eppendorf a 42°C durante 1,5 min.
5. Dejar 3 min a 4°C.
6. Cerca de una llama, sembrar en placas de LB agar (*lysogeny broth agar*, caldo de lisogénie con agar) o LB agar con X-gal (en el caso de vectores con el gen *LacZ*), extendiendo hasta la completa absorción de las bacterias en la placa.
7. Dejar a 37°C durante unas 12-18h. Evitar dejar crecer en exceso por la posible aparición de satélites cerca de las colonias (bacterias ajenas al experimento que crecen en los lugares en los que se ha agotado el antibiótico por la actuación de las bacterias que hemos sembrado).

Reactivos:

- **LB agar**

1. Añadir a una probeta:

1.1. Bacto-triptona (Becton Dickinson) 5g

1.2. Bacto yeast extract (Becton Dickinson)..... 2,5g

1.3. NaCl (Serva) 5g

1.4. H₂Oc.s.p. 500ml

2. Ajustar el pH a 7,4 con una solución de NaOH.
3. Añadir Bacto-agar (Becton Dickinson)..... 7,5g
4. Traspasar a una botella autoclavable y autoclavar.
5. Cuando se enfríe (sin llegar a polimerizar), añadir ampicilina (Normon) a una concentración final de 100µg/ml (para un volumen final de 500ml, son 200µl de una solución a 250mg/ml).
6. Cerca de una llama, traspasar el LB agar sin polimerizar a placas de Petri (Soria Genlab) y dejar enfriar hasta que polimerice.
7. Conservar a 4°C.

• **LB agar – X-gal**

1. A las placas anteriores, antes de proceder a la siembra, añadir sobre la placa y extender hasta su absorción:
 - a. X-gal (Promega) (50 µg/µl)40µl
 - b. IPTG (Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido) (357mM) (Amersham) 10µl

4.2.- Crecimiento de bacterias en medios líquidos

Una vez se han sembrado las bacterias en un medio sólido como el LB agar, se procede a su selección y pesca. Con una punta estéril y cerca de una llama, se toca una colonia con el suficiente cuidado de no tocar ninguna colonia más.

Siguiendo cerca de la llama, esta punta se deposita en el interior de un tubo de ensayo de plástico estéril de 12 ml (Falcon) con un tapón que permita el paso del aire que contenga:

1. LB 2ml
2. Ampicilina (25mg/ml) (Normon) 8µl

Se deja crecer el cultivo bacteriano durante unas 12h o hasta que se observe turbio, obteniendo lo que se llama coloquialmente una “mini”.

Si han pasado más de 18h y no se ha vuelto turbio significa que la colonia ha muerto.

Si deseamos amplificar más nuestro cultivo, traspasamos el contenido del tubo cerca de una llama a una botella estéril que contenga:

1. LB 150ml
2. Ampicilina (25mg/ml) 608µl

Se deja crecer el cultivo bacteriano durante unas 12h o hasta que se observe turbio, obteniendo lo que se llama coloquialmente una “midi” o una “maxi”, según el laboratorio.

4.3.- Purificación de plásmidos bacterianos

4.3.1.- Procesamiento de minis

Aunque hay métodos en columnas de sílica gel para aislar los plásmidos, durante esta tesis se empleó un método de precipitación, que aunque da lugar a un aislamiento de los plásmidos con una calidad baja, es suficiente para realizar comprobaciones por digestiones.

En el caso de querer plásmidos con una cierta calidad y cantidad, éstos se hicieron crecer hasta maxis y se purificaron por columnas de sílica gel.

Protocolo:

1. Pasar 1ml de mini a un eppendorf.
2. Centrifugar a máximas revoluciones durante 30seg.
3. Tirar el sobrenadante por decantación.
4. Añadir 200µl de la solución TENS y mezclar pipeteando, de forma que se homogenice el pellet y quede una mezcla viscosa y homogénea.
5. Añadir 100µl de acetato sódico 3M, pH 5,2 y mezclar por inversión.
6. Centrifugar a máximas revoluciones durante 5min.

7. Pasar el sobrenadante a un tubo eppendorf.
8. Añadir 700µl de etanol 100% y mezclar por inversión.
9. Incubar el eppendorf a -20°C durante 30min o a -80°C durante 10min.
10. Centrifugar a máximas revoluciones durante 15min.
11. Eliminar sobrenadante.
12. Añadir 1ml de etanol al 70%.
13. Centrifugar a máximas revoluciones durante 2 min.
14. Eliminar sobrenadante.
15. Añadir 1ml de etanol al 70%.
16. Centrifugar a máximas revoluciones durante 2 min.
17. Eliminar sobrenadante.
18. Centrifugar a máximas revoluciones durante 1 min para acabar de eliminar el etanol restante.
19. Eliminar sobrenadante.
20. Dejar secar el pellet a temperatura ambiente.
21. Resuspender el pellet en 20µl de TE con RNasa.

Soluciones

- **Solución de TENS (solución de Tris, EDTA, NaOH y SDS)**

1. Tris(hidroximetil)aminometano (Serva)60,55mg (10mM)
2. NaOH (Sigma).....200mg (0,1M)
3. Na₂EDTA.2H₂O (Sigma)18,61mg (1mM)
4. SDS (*sodium dodecil sulfat*e, dodecilsulfato sódico)
(Serva)250mg (0,5%)
5. H₂Oc.s.p. 50ml

- **Solución de TE (solución de Tris y EDTA)**

1. Tris(hidroximetil)aminometano (Serva)60,55mg
(10mM)
2. Na₂EDTA.2H₂O (Sigma)18,61mg (1mM)
3. H₂Oc.s.p. 50ml
4. Ajustar a pH 7.0
5. Suplementar la cantidad que se vaya a utilizar con Ribonucleasa
(RNasa, Sigma)c.s.p. 50µg/ml

4.3.2.- Procesamiento de maxis

Para la purificación de maxis se utilizó el kit de Qiagen Plasmid maxi kit.

Protocolo:

1. Centrifugar 150ml de maxi en tubos de 35ml a 6000g, durante 15 min a 4°C.
2. Eliminar el SN por decantación.
3. Resuspender el pellet en 10ml de tampón P1.
4. Añadir 10ml de tampón P2 y agitar por inversión 4 o 5 veces.
5. Incubación a temperatura ambiente durante 5 min.
6. Añadir 10ml de tampón P3 (enfriado previamente) y agitar por inversión 4 o 5 veces.
7. Incubar en hielo durante 20 min.
8. Centrifugar a $\geq 20.000g$ durante 30 min a 4°C.
9. Traspasar sobrenadante, con la precaución de no arrastrar ningún residuo sólido a un nuevo tubo de 35ml.
10. Centrifugar a $\geq 20.000g$ durante 15 min a 4°C.
11. Añadir a una columna QIAGEN-tip 500 10ml del tampón de equilibración QBT, despreciando el eluyente.

12. Añadir a la columna los 30ml de sobrenadante obtenidos de la última centrifugación, con la precaución de no arrastrar ningún residuo sólido.
13. Despreciar el eluyente.
14. Añadir 30ml del tampón QC a la columna.
15. Despreciar el eluyente.
16. Añadir 30ml del tampón QC a la columna.
17. Despreciar el eluyente.
18. Añadir 15ml del tampón QF y recoger el eluyente en un nuevo tubo de 35ml.
19. Añadir 10.5ml de isopropanol al tubo de 35ml y agitar hasta su homogenización.
20. Incubar 30min a -20°C.
21. Centrifugar a $\geq 15.000g$ durante 30 min a 4°C.
22. Eliminar sobrenadante con la precaución de no arrastrar el pellet.
23. Añadir 400 μ l de etanol 70% y resuspender el pellet.
24. Traspasar los 400 μ l a un eppendorf.
25. Añadir 400 μ l más de etanol 70% en el tubo de 35ml.
26. Recoger lo que quede de pellet.
27. Traspasar al eppendorf.
28. Añadir 400 μ l más de etanol 70% en el tubo de 35ml.
29. Recoger lo que quede de pellet.
30. Traspasar al eppendorf.
31. Centrifugar a $\geq 15.000g$ durante 10 min a 4°C.
32. Eliminar el sobrenadante con cuidado de no despegar el pellet.
33. Añadir 1ml de etanol 70% al eppendorf.
34. Centrifugar a $\geq 15.000g$ durante 10 min a 4°C.

35. Eliminar el sobrenadante con cuidado de no despegar el pellet.
36. Centrifugar a $\geq 15.000g$ durante 30 seg a $4^{\circ}C$.
37. Acabar de eliminar los restos de sobrenadante con cuidado de no despegar el pellet.
38. Dejar secar a temperatura ambiente.
39. Resuspender en unos $200\mu l$ de TE.

5.- ADENOVIRUS

Las construcciones víricas permiten sobreexpresar un gen con una eficiencia elevada. Los adenovirus tienen como principales ventajas la facilidad de su producción una vez formados los primeros adenovirus, la elevada eficiencia de infección, su seguridad respecto a otros virus (lentivirus por ejemplo) y la elevada concentración a la que se pueden llegar a obtener. Como principal problema, por ejemplo respecto a los lentivirus, es que permiten tan solo una expresión transitoria de los genes, ya que son virus que no se integran en el DNA.

5.1.- Generación de adenovirus

La generación de adenovirus se basa en la transfección de células HEK-293 con dos plásmidos que contienen la información necesaria para crear los adenovirus. Las células HEK-293 (*human epithelial kidney-293*, células epiteliales de riñón humano-293) fueron cedidas por el Dr. CB Newgard.

Protocolo (para 1 pozo de una placa de 6 pozos):

1. Sembrar $2-3 \cdot 10^5$ células HEK-293 por pocillo de placa de 6 pocillos.
2. Al día siguiente o cuando se obtenga una confluencia de un 40-70%, realizar la transfección:

A. Transfección por Superfect (Qiagen)

3. Añadir en un eppendorf estéril (por pocillo):
 - 3.1. Plásmido pJM17 c.s.p. $2\mu\text{g}$
 - 3.2. Plásmido pCCMV.pLpA con el gen de interés c.s.p. $4-8\mu\text{g}$

Ratio pJM17: pCCMV.pLpA 1:2 – 1:4

 - 3.3. Medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, medio de águila modificado por Dulbecco, Sigma) sin suplementar c.s.p. $150\mu\text{l}$
 - 3.4. Superfect (Qiagen) $30-70\mu\text{l}$

Ratio DNA:Superfect ($\mu\text{l}/\mu\text{g}$) 1:5 – 1:7

4. Pipetear para homogenizar la muestra.
5. Incubar 10 min a temperatura ambiente.
6. Añadir 1.2ml de medio de cultivo completo para células HEK-293.
7. Pipetear para homogenizar la muestra.
8. Aspirar el medio de cultivo a las placas.
9. Añadir 2ml de DPBS (Sigma).
10. Aspirar el DPBS de las placas.
11. Añadir el contenido del eppendorf a un pocillo de la placa.
12. Incubar de 3 a 5 horas en el incubador a 37°C.
13. Aspirar el medio de cultivo a las placas.
14. Añadir 2ml de DPBS.
15. Aspirar el DPBS de las placas.
16. Añadir 3ml de medio de cultivo completo para células HEK-293.
17. Dejar crecer durante una semana sin cambiar el medio.

B. Transfección por Fugene6 (Roche)

3. Añadir en un eppendorf estéril (por pocillo):
 - 3.1. Plásmido pJM17..... c.s.p. 3µg
 - 3.2. Plásmido pCCMV.pLpA con el gen de interés..... c.s.p 2-8µg
 Ratio pJM17: pCCMV.pLpA 1.5:1 – 1:4
 - 3.3. Medio DMEM sin suplementar c.s.p. 100µl
 - 3.4. Fugene6 (Roche)..... 6-9µl
 Ratio DNA:Fugee6 (µl/µg) 1:1 – 1:2
4. Pipetear para homogenizar la muestra.
5. Incubar 30 min a temperatura ambiente.

6. Añadir gota a gota el contenido del eppendorf a cada pocillo (cada pocillo contiene unos 2 ml de medio).
7. Al cabo de 2 días añadir 2 ml de medio de cultivo completo para células HEK-293.
8. Dejar crecer durante cinco días sin cambiar el medio.

Observación de clapas

1. Al cabo de una semana, comprobar si aparecen zonas en que se observe una lisis celular (clapas). Las clapas aparecen como muy pronto a las 2 semanas tras la transfección y como máximo a las 4 semanas
 - 1.1. Si aparecen clapas, dejar el medio durante 2-3 días hasta que se observe una lisis completa del pocillo. Momento en el que se procede a aspirar el medio que contiene los adenovirus y a su congelación.
 - 1.2. Si no aparecen clapas, pero el medio se agota (cambia de pH y amarillea), añadir (sin cambiar el medio) medio de cultivo nuevo (unos 2ml) e ir observando cada 3 o 4 días. Si transcurridas 4 semanas no han aparecido clapas repetir la transfección.

Soluciones:

- Medio de cultivo HEK-293

	[] inicial	[] final	Cantidad
DMEM (4,5 g/l glucosa) (Sigma)	-	-	500 ml
FBS (<i>fetal bovine serum</i>, suero bovino fetal, Invitrogen)	100%	10%	56,8 ml
Penicilina / estreptomicina (Lonza)	5000 U/ml	50 U/ml	5,7 ml
L-Glutamina (Lonza)	200mM	2mM	5,7 ml

5.2.- Amplificación de adenovirus

Protocolo:

1. Sembrar células HEK-293 en flascos de 25, 75 o 175cm²
2. Cuando las células estén al 80% de confluencia aspirar el medio.
3. Añadir 2, 10 o 20 ml de DPBS.
4. Aspirar el DPBS.
5. Preparar 5, 15 o 35ml de medio al que se le ha añadido unos 0,1, 0,3 o 0,5 ml de adenovirus (cantidades orientativas, mayor cantidad de adenovirus, más rápido es la producción de adenovirus, mayor volumen de medio, más diluidos estarán los adenovirus finales).
6. Añadir el medio con los adenovirus a los flascos.
7. Dejar hasta la completa lisis del flascón (unas 24h).
8. Recoger el medio de cultivo, pipeteando de forma que se arrastren las células que hayan podido quedar adheridas al flascón y se lisen por un mecanismo físico.
9. Congelar el medio de cultivo con los adenovirus.
10. Descongelar el medio de cultivo con los adenovirus.
11. Centrifugar a 500g, 5 min y a 4°C.
12. Recoger sobrenadante y despreciar el pellet.
13. Alicuotar y volver a congelar, obteniendo el lisado crudo adenoviral.

5.3.- Aislamiento de DNA vírico

Para comprobar que los adenovirus que estamos generando son los que nos interesan, extraemos el DNA viral del lisado crudo adenoviral para realizar las comprobaciones pertinentes por PCR o secuenciación.

Protocolo:

1. Añadir a un eppendorf:
 - 1.1. Lisado crudo adenoviral 250µl
 - 1.2. Solución de lisis..... 250µl
2. Incubar 1 hora a 56°C.

3. Añadir 0,5 ml de fenol:cloroformo:isoamil alcohol (25:24:1, pH 8,0, EDTA 1mM, Sigma).
4. Agitar para su homogenización.
5. Centrifugar a $\geq 10.000g$ durante 5 min.
6. Recoger la fase superior y traspasar a un nuevo eppendorf.
7. Añadir 0,5 ml de fenol:cloroformo:isoamil alcohol (25:24:1, pH 8,0, EDTA 1mM, Sigma).
8. Agitar para su homogenización.
9. Centrifugar a $\geq 10.000g$ durante 5 min.
10. Recoger la fase superior y traspasar a un nuevo eppendorf.
11. Añadir 50 μ l de acetato sódico 3M, pH 5,2.
12. Añadir 1ml de etanol absoluto.
13. Incubar a $-20^{\circ}C$ durante 1 hora.
14. Centrifugar a máximas revoluciones (20.000 g por ejemplo) durante 20 min a $4^{\circ}C$.
15. Eliminar el sobrenadante.
16. Añadir 1ml de etanol al 70%.
17. Centrifugar a máximas revoluciones (20.000 g por ejemplo) durante 5 min a $4^{\circ}C$.
18. Eliminar el sobrenadante.
19. Centrifugar a máximas revoluciones (20.000 g por ejemplo) durante 1 min a $4^{\circ}C$.
20. Eliminar el sobrenadante apurando.
21. Dejar secar a temperatura ambiente.
22. Resuspender el pellet con solución TE suplementada con RNasas.

Soluciones:

- **Solución de lisis**

1. Proteinasa K a 20mg/ml (Invitrogen)..... 25µl
2. Solución de EDTA 0.5M, pH 8,0 (Sigma) 80µl
3. SDS (20% en agua) (Serva) 5µl
4. H₂O c.s.p. 1000µl

5.4.- Titulación de adenovirus

Para saber la concentración de partículas víricas que hemos obtenido tras la amplificación hay varios ensayos. El que aquí se explica (*limiting dilution plaque assay*, ensayo de dilución límite formadora de clapas) se basa en la realización de una batería de diluciones, observando cual es la máxima dilución capaz de lisar las células HEK-293.

Protocolo (realizar por duplicado):

1. Tripsinizar un flascón de 75cm² con HEK-293 en confluencia, contar las células y preparar una dilución de 3.10⁵ células/ml en medio de HEK-293.
2. Sembrar 100µl por pocillo de la suspensión de células (2.10⁴ células) en una placa de 96 pocillos.
3. Incubar a 37°C unas 24h.
4. Preparar la batería de diluciones:
 - 4.1. Dilución 10⁻²: Añadir a un eppendorf 495 µl de medio de HEK más 5µl de la solución de adenovirus que queremos titular. Homogenizar pipeteando.
 - 4.2. Dilución 10⁻⁴: Añadir a un eppendorf 495 µl de medio de HEK más 5µl de la dilución 10⁻². Homogenizar pipeteando.
 - 4.3. Dilución 10⁻⁶: Añadir a un eppendorf 495 µl de medio de HEK más 5µl de la dilución 10⁻⁴. Homogenizar pipeteando.
 - 4.4. Dilución 10⁻⁷: Añadir a un tubo de ensayo de 5ml (BectonDickinson) 1,8ml de medio de HEK más 200µl de la dilución 10⁻⁶. Homogenizar pipeteando.

- 4.5. Dilución 10^{-8} : Añadir a un tubo de ensayo de 5ml (BectonDickinson) 1,8ml de medio de HEK más 200 μ l de la dilución 10^{-7} . Homogenizar pipeteando.
- 4.6. Dilución 10^{-9} : Añadir a un tubo de ensayo de 5ml (BectonDickinson) 1,8ml de medio de HEK más 200 μ l de la dilución 10^{-8} . Homogenizar pipeteando.
- 4.7. Dilución 10^{-10} : Añadir a un tubo de ensayo de 5ml (BectonDickinson) 1,8ml de medio de HEK más 200 μ l de la dilución 10^{-9} . Homogenizar pipeteando.
- 4.8. Dilución 10^{-11} : Añadir a un tubo de ensayo de 5ml (BectonDickinson) 1,8ml de medio de HEK más 200 μ l de la dilución 10^{-10} . Homogenizar pipeteando.
- 4.9. Dilución 10^{-12} : Añadir a un tubo de ensayo de 5ml (BectonDickinson) 1,8ml de medio de HEK más 200 μ l de la dilución 10^{-11} . Homogenizar pipeteando.
- 4.10. Dilución 10^{-13} : Añadir a un tubo de ensayo de 5ml (BectonDickinson) 1,8ml de medio de HEK más 200 μ l de la dilución 10^{-12} . Homogenizar pipeteando
- 4.11. Dilución 10^{-14} : Añadir a un tubo de ensayo de 5ml (BectonDickinson) 1,8ml de medio de HEK más 200 μ l de la dilución 10^{-13} . Homogenizar pipeteando
5. Añadir a cada fila de la placa de 96 pocillos 100 μ l de una de las diluciones, partiendo de la dilución 10^{-7} y acabando en la dilución 10^{-14} , dejando las columnas 11 y 12 libres (ver Fig. 17).
6. Añadir a las columnas 11 y 12 100 μ l de medio sin adenovirus (control negativo).
7. Dejar la placa en el incubador durante 10 días.
8. Observar cada pocillo y anotar aquellos en lo que se observa una lisis celular (presencia de clapas).

9. Calcular la concentración de adenovirus con la siguiente fórmula, donde C es la concentración obtenida en PFU/ml (PFU, *plate forming units*, unidades formadoras de clapas):

$$A_i = \frac{\text{Pocillos positivos}}{10} \quad ; \quad i = 10^{-1} \dots 10^{-14}$$

$$B = \sum A_i$$

$$C = 10^{[(B-0.2) \times 10]} \quad \text{PFU / ml}$$

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Control negativo	
												11	12
Dilución	10 ⁻⁷	A											
	10 ⁻⁸	B											
	10 ⁻⁹	C											
	10 ⁻¹⁰	D											
	10 ⁻¹¹	E											
	10 ⁻¹²	F											
	10 ⁻¹³	G											
	10 ⁻¹⁴	H											

Fig. 17. Representación esquemática de cómo distribuir las diferentes diluciones de adenovirus en una placa de 96 pocillos.

6.- CULTIVOS

6.1.- Cultivos de líneas celulares

Principalmente, las líneas celulares con las que se realizó este trabajo fueron las HEK-293 para la producción de adenovirus y las INS-1-E y las INS-1-832/13 para realizar estudios funcionales. Las HEK ya han sido descritas en apartados anteriores. Las INS-1-E y las INS-1-832/13 derivan de las células INS-1, provenientes de un insulinoma de rata inducido por radiaciones [101]. Las células INS-1-E son una selección clonal de las células INS-1 [102], que fueron cedidas por el Dr. P Maechler y se utilizaron para los estudios del tungstato de sodio y de los sueros de los diferentes animales sanos y diabéticos y tratados y no tratados con tungstato de sodio. Las células INS-1-832/13 provienen de la transfección estable del gen de la proinsulina humana y una posterior selección de clones con una secreción de insulina inducida por glucosa robusta [103]. Estas células fueron cedidas por el Dr. CB Newgard y se utilizaron para observar la secreción de insulina inducida por glucosa tras la sobreexpresión de varias isoformas de Tmem27.

6.1.1.- Tripsinización y pasaje

Las líneas celulares estudiadas son adherentes y crecen en un medio de cultivo líquido. En el caso de las células INS-1-E tienen una cierta preferencia por plásticos tratados por la casa comercial Falcon, aunque crecen bien en otras superficies. Si bien depende de la cantidad de células sembradas, como norma general, las células INS-1-E e INS-1-832/13 requieren ser pasadas una vez por semana, mientras que las células HEK-293 requieren ser pasadas dos veces por semana, ya que su velocidad de replicación es mayor. Además, las células INS-1-E e INS-1-832/13 no suelen llegar a una confluencia del 100%, si no que se estancan al 80-90%, mientras que las células HEK-293 llegan a una confluencia del 100%. Por último, comentar que las células INS-1-E e INS-1-832/13, una vez tripsinizadas y resuspendidas se pasan en un ratio 1:5 (si se ha tripsinizado un flascón de 75cm² y se ha resuspendido en 10ml, se siembra un flascón de 75cm² con 2ml de células más 15ml de medio), mientras que las células HEK-293 se pasan a un ratio 1:10.

Protocolo (flascón de 75cm²):

1. Aspirar el medio de cultivo.
2. Añadir 10ml de DPBS (Sigma).
3. Aspirar el DPBS.
4. Añadir 1,5ml de tripsina (Invitrogen).
5. Incubar 5 min a 37°C.
6. Añadir 10ml de medio completo y pipetear para arrancar las células.
7. Recoger el medio y centrifugarlo a 500g, 5min, 4°C.
8. Eliminar sobrenadante.
9. Resuspender en 10ml de medio.

Soluciones:

- Medio de cultivo completo INS-1-E e INS-1-832/13

	[] inicial	[] final	Cantidad
DMEM (sin glucosa) (Biosera)	-	-	500 ml
FBS (Invitrogen)	-	5%	27,8ml
2-β-mercaptoetanol (Sigma)	14,3M	50μM	1,84μl
HEPES Na (4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfonato sódico) (Cambrex)	1M	10mM	5,6 ml
Penicilina / estreptomicina (Lonza)	5000 U/ml	100 U/ml	11,1 ml
L-Glutamina (Lonza)	200mM	2mM	5,6 ml
Piruvato sódico (Cambrex)	100 mM	1mM	5,6 ml
D-(+)-Glucosa.H₂O (Merck)	-	5,5mM	605mg

6.1.2.- Recuento

6.1.2.1.- Manual

Se marcó una pequeña muestra (10 μ l) de las células tripsinizadas y resuspendidas con el colorante vital azul de tripano (10 μ l de suspensión de células a contabilizar más 90 μ l de solución de azul de tripano al 0,4% (Invitrogen)) y se procedió a su recuento con una cámara de Neubauer, contando las células transparentes (viables). Las células azules (no viables) no se contaron. Se contaron tres cuadrados en diagonal si los resultados eran bastante homogéneos entre los diferentes cuadrados, o bien 9 cuadrados si los resultados eran heterogéneos y se calculó la media. La cantidad de células por cuadrado obtenido se multiplicó por 0,1, de forma que se obtenía el número de células expresado en millones de células por mililitro.

6.1.2.2.- Automático

Para el recuento automático de células se procedió a teñir con 10 μ l del colorante vital azul de tripano a 10 μ l de células a contabilizar. A continuación, se traspasó 10 μ l de la mezcla a una cámara Neubauer adecuada y se procedió a su lectura con el contador automático de células Countess (Invitrogen), que a través del perfil óptico, tamaño y color de las células nos da su concentración en la suspensión.

6.1.3.- Infección de células

Para el estudio de los efectos de la sobreexpresión de las diferentes isoformas de Tmem27 sobre la línea INS-1-832/13, se utilizaron adenovirus que codificaban para estos genes.

Protocolo (ej. pocillo de una placa de 24 pozos):

1. Sembrar las células en los pocillos de la placa de 6 pozos.
2. A las 24 horas, preparar 500 μ l de medio de cultivo con adenovirus a una concentración de 50 moi (*multiplicity of infection*, multiplicidad de infección).

Por ejemplo:

- Concentración del lisado de adenovirus: 1,39.10⁹ PFU/ml.

- Cantidad de células en el pocillo: $0.3 \cdot 10^6$ células.
 - moi: 50.
 - Volumen final: 500 μ l.
 - Solución de infección: 490 μ l de medio de cultivo + 10,8 μ l de lisado de adenovirus.
3. Extraer el medio de cultivo de las células.
 4. Añadir el medio de cultivo que contiene los adenovirus.
 5. Incubar 2 horas a 37°C.
 6. Extraer el medio de cultivo de las células.
 7. Añadir medio de cultivo sin adenovirus.

6.1.4.- Tratamiento de placas con poli-L-lisina

Cuando el medio de las células se cambia muchas veces (por ejemplo en estudios de secreción de insulina), las células suelen desengancharse del fondo del pocillo. Para aumentar su adherencia, se trataron las placas con poli-L-lisina.

Protocolo:

1. Añadir solución de poli-L-lisina al 0,01% en cantidad suficiente como para cubrir el fondo de la placa o pocillo.
2. Incubar 1h a 37°C.
3. Extraer solución de poli-L-lisina.
4. Añadir la misma cantidad de DPBS.
5. Extraer solución de DPBS.
6. Añadir la misma cantidad de DPBS.
7. Extraer solución de DPBS.
8. Añadir la misma cantidad de medio de cultivo.
9. Extraer medio de cultivo.

Soluciones:

- **Solución de poli-L-lisina al 0,01%**

1. Solución de poli-L-lisina 0,1% (Sigma) 1ml
2. H₂O..... 9ml

6.1.5.- Estudios de proliferación

Para estudiar los niveles de proliferación de las células a diferentes estímulos o sobreexpresando diferentes genes, se utilizaron dos metodologías basadas en el crecimiento de las células en un medio que contiene un nucleótido modificado (³H-metil-timidina o BrdU (bromodeoxiuridina)). Así, se observó la incorporación de este nucleótido a través de la cantidad de radioactividad que emiten las células, o bien a través de técnicas inmunocitoquímicas y posterior análisis por FACS (*Fluorescence-activated cell sorting*, separación de células activadas por fluorescencia).

6.1.5.1.- Utilización de ³H-[metil]timidina

Este protocolo se utilizó para observar como el tungstato o el suero de los diferentes animales (diabéticos y no diabéticos y tratados con tungstato y no tratados) afectaba a la proliferación de las células INS-1-E.

Protocolo:

1. Sembrar las células INS-1-E en placas de 96 pocillos a una densidad de $3,6 \cdot 10^5$ células por pocillo.
2. Al cabo de dos días, sustituir el medio de las células por medio de cultivo básico complementado con tungstato de sodio a 100 μ M o 10% de suero proveniente de los diferentes modelos animales de experimentación (ratas sanas y diabéticas y tratadas y no tratadas con tungstato de sodio), añadiéndole cuando se indica el inhibidor de MEK PD-98059 (Calbiochem) a 20 μ M.
3. 24 horas más tarde, añadir hidroxIUrea (Sigma) a una concentración final de 12,5mM, con tal de sincronizar las células en el mismo punto del ciclo celular (fase S).

4. 24 horas más tarde, extraer el medio.
5. Añadir 200µl de DPBS por pocillo para eliminar la hidroxiuurea.
6. Extraer el DPBS.
7. Añadir 200µl de DPBS por pocillo.
8. Extraer el DPBS.
9. Añadir 200µl de medio básico suplementado con 1µCi de ³H-metil-timidina (actividad específica inicial de 74 GBq/mmol, GE Healthcare) y tungstato de sodio a 100µM o 10% de suero proveniente de los diferentes modelos animales de experimentación.
10. A las 4 horas, congelar la placa de 96 pocillos.
11. Descongelar.
12. Proceder a arrancar las células de los pocillos y pasar cada pocillo a una membrana con un Cell Harvester (Wallac/Perkin Elmer).
13. Añadir a la membrana líquido de centelleo (Perkin Elmer).
14. Cuantificar las radiaciones β de cada pocillo través de un contador BetaPlate (Wallac/Perkin Elmer).

Soluciones:

- **Medio de cultivo básico**

	[] inicial	[] final	Cantidad
DMEM (sin glucosa) (Biosera)	-	-	500 ml
2-β-mercaptoetanol (Sigma)	14,3M	50µM	1,84µl
HEPES Na (Cambrex)	1M	10mM	5,3 ml
Penicilina / estreptomicina (Lonza)	5000 U/ml	100 U/ml	10,5 ml
L-Glutamina (Lonza)	200mM	2mM	5,3 ml
Piruvato sódico (Cambrex)	100 mM	1mM	5,3 ml

BSA (Sigma)	-	0,1%	0,52g
D(+)-Glucosa.H₂O (Merck)	-	5,5mM	573mg

6.1.5.2.- Utilización de BrdU

Este protocolo se utilizó para observar como la sobreexpresión de las diferentes isoformas de Tmem27 afectaban a la proliferación de las células INS-1-832/13.

Para el análisis de la incorporación de BrdU se utilizó el kit de Becton Dickinson FITC BrdU Flow Kit.

Protocolo:

1. Se sembraron en placas de 6 cm (Greiner Bio-one) $2 \cdot 10^6$ células INS-1-832/13.
2. A las 24 horas se infectaron con los adenovirus correspondientes.
3. 48 horas tras la infección se aspiró el medio.
4. Añadir 3 ml de DPBS.
5. Aspirar el DPBS.
6. Añadir 5ml de medio de INS-1-832/13 suplementado con 50 μ l de BrdU 1mM (Sigma).
7. Dejar 2 horas.
8. Tripsinizar las células, resuspendiendo el pellet en DPBS y contarlas.
9. Separar $1 \cdot 10^6$ células y centrifugar a 500g, 5 min, 4°C.
10. Eliminar sobrenadante.
11. Resuspender en 100 μ l del tampón BD Cytotfix/Cytoperm.
12. Incubar 30 min a 4°C.
13. Centrifugar a 300g, 5 min, 4°C.
14. Eliminar sobrenadante.
15. Resuspender en 1ml del tampón BD Perm/Wash.
16. Centrifugar a 300g, 5min, 4°C.

17. Eliminar sobrenadante.
18. Resuspender en 100µl del tampón BD Cytoperm Plus.
19. Incubar 10 min a 4°C.
20. Centrifugar a 300g, 5 min, 4°C.
21. Eliminar sobrenadante.
22. Resuspender en 1ml del tampón BD Perm/Wash.
23. Centrifugar a 300g, 5 min, 4°C.
24. Eliminar sobrenadante.
25. Resuspender en 100µl del tampón BD Cytotfix/Cytoperm.
26. Incubar 5 min a 4°C.
27. Centrifugar a 300g, 5 min, 4°C.
28. Eliminar sobrenadante.
29. Resuspender en 1ml del tampón BD Perm/Wash.
30. Centrifugar a 300g, 5 min, 4°C.
31. Eliminar sobrenadante.
32. Resuspender en 100µl de la solución de DNasa (30µl de DNasa madre más 70µl de DPBS).
33. Incubar 1 h a 37°C.
34. Centrifugar a 300g, 5 min, 4°C.
35. Eliminar sobrenadante.
36. Resuspender en 1ml del tampón BD Perm/Wash.
37. Centrifugar a 300g, 5 min, 4°C.
38. Eliminar sobrenadante.
39. Resuspender en 50µl de la solución de anticuerpo anti-BrdU-FITC (1µl de anticuerpo anti-BrdU-FITC más 49µl de tampón BD Perm/Wash).

40. Incubar 20 min a temperatura ambiente.
41. Centrifugar a 300g, 5 min, 4°C.
42. Eliminar sobrenadante.
43. Resuspender en 1ml del tampón BD Perm/Wash.
44. Centrifugar a 300g, 5 min, 4°C.
45. Eliminar sobrenadante.
46. Resuspender en 20µl de la solución de 7-AAD (7-amino-actinomicina D).
47. Incubar 10 min a temperatura ambiente.
48. Centrifugar a 300g, 5 min, 4°C.
49. Eliminar sobrenadante.
50. Resuspender en 1ml del tampón BD Perm/Wash.
51. Centrifugar a 300g, 5 min, 4°C.
52. Eliminar sobrenadante.
53. Resuspender en 1ml del tampón BD Perm/Wash.

Las muestras se analizaron en la unidad de citómica utilizando el citómetro FACS Canto II (Becton Dickinson) con la ayuda de Isabel Crespo.

6.1.6.- Estudios de secreción de insulina

Se realizaron estudios de secreción de insulina en las células INS-1-832/13 tras su infección con las diferentes isoformas de Tmem27 y β-gal, para observar como afectaba la sobreexpresión de estos genes a la secreción de insulina inducida por glucosa.

Protocolo:

1. Sembrar $0,3 \cdot 10^6$ células por pocillo en placas de 24 pocillos tratadas previamente con poli-L-lisina (Sigma), realizando triplicados por condición.
2. Tras 24 horas, infectar las células.

3. Tras 48 horas después de realizar la infección, extraer el medio de cultivo.
4. Añadir 0,5ml de DPBS por pocillo.
5. Extraer el DPBS.
6. Añadir 0,5ml de DPBS por pocillo.
7. Extraer el DPBS.
8. Añadir 0,5ml de solución de secreción sin glucosa por pocillo.
9. Incubar 2 horas a 37°C.
10. Extraer el de medio de secreción
11. Añadir 0,5ml de solución de secreción suplementada con glucosa (concentración final de 2,2 o 16,7mM).
12. Incubar 90 min a 37°C.
13. Recoger el medio de secreción y congelar.
14. Añadir 0,5ml de tripsina por pocillo.
15. Incubar 5 min a 37°C.
16. Recoger las células y transferirlas a un eppendorf.
17. Centrifugar a 500g, 5 min, 4°C.
18. Eliminar sobrenadante.
19. Resuspender en 0.5ml de DPBS.
20. Centrifugar a 500g, 5 min, 4°C.
21. Eliminar sobrenadante.
22. Congelar pellet.

Con el medio de secreción recogido se mide la insulina secretada (dilución 1:5 para las muestras a 2,2mM y de 1:25 para las muestras de 16,7mM) y con las células congeladas se observa la cantidad de DNA por pocillo.

Soluciones:

- **Medios de secreción**

1. Solución I

1. NaCl (Serva) 2,68g (460mM)
2. H₂O..... c.s.p. 100mL

2. Solución II

1. NaHCO₃ (Serva)..... 0,806g (96mM)
2. KCl (Merck) 0,149g (20mM)
3. MgCl₂.6H₂O (Sigma)..... 0,0812g (4mM)
4. H₂O..... c.s.p. 100mL

3. Solución III

1. CaCl₂.2H₂O (Sigma) 0,147g (10mM)
2. H₂O..... c.s.p. 100mL

4. HEPES 1M

1. HEPES-Na (Fluka) 26,03g (1M)
2. H₂O..... c.s.p. 100mL

5. Glucosa 1M

1. D-(+)-Glucosa.H₂O (Merck)..... 1,981g (1M)
2. H₂O..... c.s.p. 10mL

- **Solución de secreción sin glucosa**

1. Solución I25mL
2. Solución II25mL
3. Solución III25mL
4. HEPES 1M2mL
5. BSA (Sigma).....0,5g

6. H₂O.....23mL

Ajustar a pH 7,4

- **Solución de secreción a 2,2mM glucosa**

1. Solución de secreción sin glucosa 10mL

2. Glucosa 1M 22µL

- **Solución de secreción a 16,7mM glucosa**

1. Solución de secreción sin glucosa 10mL

2. Glucosa 1M 167µL

6.1.7.- Estudios de contenido de DNA

Para normalizar la secreción de insulina se valoró el contenido de DNA de las células que habían en cada pocillo una vez finalizado el experimento de secreción de insulina.

Protocolo:

1. Descongelar los pellets de células.
2. Añadir 500µl de la solución TE-NaCl.
3. Sonicar las células durante 10seg a 10W (muestras en hielo).
4. Preparar en una placa de 96 pocillos:
 - Curva patrón (en duplicado o triplicado):

TE-NaCl 1x	DNA estándar	Hoechst (20µg/mL)	Cantidad de DNA
180 µL	0 µL	20 µL	0
178 µL	2 µL a 10 µg/µL	20 µL	20 ng
175 µL	5 µl a 10 µg/µL	20 µL	50 ng
170 µL	10 µL a 10 µg/µL	20 µL	100 ng
178 µL	2 µL a 100 µg/µL	20 µL	200 ng
175 µL	5 µl a 100 µg/µL	20 µL	500 ng

170 µL	10 µL a 100 µg/µL	20 µL	1000 ng
--------	-------------------	-------	---------

- Muestras (en triplicado):

- i. Muestra 150 µL
- ii. TE-NaCl 1x..... 30 µL
- iii. Hoechst 20 µg/mL 20 µL

5. Leer en un fluorómetro con una excitación de 360nm y una emisión de 460nm.

6. Realizar cálculos por regresión lineal.

7. Multiplicar valores por 3,33 (factor de corrección por dilución, se valoran 150µl de 500µl totales).

Soluciones:

- **TE, 100 mL**

- 1. Tris (Serva) 121,1mg (10mM)
- 2. Na₂EDTA.2H₂O (Sigma) 37,24mg (1mM)
- 3. H₂O..... c.s.p. 100mL

Ajustar pH a 7,4 con HCl

- **TE-NaCl, 100 mL, 10x**

- 1. Tris (Serva) 1,211g (100mM)
- 2. Na₂EDTA.2H₂O (Sigma) 372,44mg (10mM)
- 3. NaCl (Serva) 11,68g (2M)
- 4. H₂O c.s.p. 100mL

Ajustar pH a 7,4 con HCl

- **TE-NaCl, 1x**

- 1. TE-NaCl 10x..... 1mL
- 2. H₂O 9mL

- **DNA de bazo de ternero (*DNA Calf Thymus*) 1mg/mL**
 1. DNA Calf Thymus (Sigma) 1mg
 2. TE 1mL
- **DNA de bazo de ternero (*DNA Calf Thymus*) 100µg/mL**
 1. DNA Calf Thymus 1mg/mL..... 100µL
 2. TE 900µL

Alicuotar en 100 µL
- **DNA Calf Thymus 10µg/mL**
 1. DNA Calf Thymus 1mg/mL10µL
 2. TE 990µL
- **Hoechst 33258 (Sigma) 1mg/mL**
 1. Hoechst 10mg
 2. H₂O..... 10mL
- **Hoechst 33258 20µg/mL**
 1. Hoechst 1mg/mL 20µL
 2. TE-NaCl 1x..... 980µL

6.1.8.- Estudios de fosforilación

Se estudió el efecto del tungstato de sodio y de los sueros de los diferentes modelos experimentales (ratas sanas y diabéticas, así como tratadas y no tratadas con tungstato de sodio) sobre la fosforilación de la vía de las MAPK en las células INS-1-E.

Protocolo:

1. Sembrar $0,7 \cdot 10^6$ células por pocillo en placas de 6 pocillos.
2. A las 48 horas, aspirar el medio de cultivo y añadir 2ml de DPBS.
3. Aspirar el DPBS.
4. Añadir 3ml de medio de cultivo básico no estimulador.

5. Incubar las células 6h a 37°C.
6. Aspirar el medio de cultivo.
7. Añadir 1,2ml de medio de cultivo básico no estimulador suplementado con tungstato de sodio (concentración final 100µM) o suero de los diferentes animales (concentración final 10%).
8. Dejarlo 5, 15, 30 o 60 min, según la condición.
9. Aspirar el medio de cultivo.
10. Añadir 2ml de DPBS.
11. Aspirar el medio de cultivo.
12. Añadir 2ml de DPBS.
13. Aspirar el medio de cultivo.
14. Congelar la placa.

Soluciones:

- Medio de cultivo básico no estimulador

	[] inicial	[] final	Cantidad
DMEM (sin glucosa) (Biosera)	-	-	500 ml
2-β-mercaptoetanol (Sigma)	14,3M	50µM	1,84µl
HEPES Na (Cambrex)	1M	10mM	5,3 ml
Penicilina / estreptomicina (Lonza)	5000 U/ml	100 U/ml	10,5 ml
L-Glutamina (Lonza)	200mM	2mM	5,3 ml
Piruvato sódico (Cambrex)	100 mM	1mM	5,3 ml

6.1.9.- Estudios de secreción de Tmem27

Para observar cómo Tmem27 era escindido y su parte extracelular liberada al medio de cultivo, se lavaron las células con DPBS y se cultivaron en medio de cultivo sin suero

bovino fetal durante 24-48 horas, ya que su elevado contenido en albúmina dificulta realizar Western Blots y podrían contener Tmem27 escindido.

Soluciones:

- Medio de cultivo para la observación de Tmem27 en el sobrenadante

	[] inicial	[] final	Cantidad
DMEM (sin glucosa) (Biosera)	-	-	500 ml
2-β-mercaptoetanol (Sigma)	14,3M	50μM	1,84μl
HEPES Na (Cambrex)	1M	10mM	5,3 ml
Penicilina / estreptomycin (Lonza)	5000 U/ml	100 U/ml	10,5 ml
L-Glutamina (Lonza)	200mM	2mM	5,3 ml
Piruvato sódico (Cambrex)	100 mM	1mM	5,3 ml
D-(+)-Glucosa.H ₂ O (Merck)	-	5,5mM	573mg

6.2.- Cultivos primarios: islotes

Aunque existen cultivos celulares de células beta inmortalizadas, los cultivos primarios presentan menos alteraciones (aberraciones genéticas). Es por ello que siempre los resultados obtenidos en líneas celulares se comprueban en cultivos primarios.

Los islotes, una vez aislados, si no se procedió a extraer su RNA, proteínas o realizar estudios de secreción de insulina inducida por glucosa, se cultivaron para sobreexpresar diferentes genes y ver como influían en la secreción de insulina inducida por glucosa.

6.2.1.- Cultivo de islotes de rata

Para su cultivo, se utilizaron placas no adherentes (Sarstedt), ya que se manipulan como unidades tridimensionales y no se expanden.

Una vez se extrajeron, se cultivaron en medio de cultivo a 5,5mM de glucosa durante unas 12 horas. Si el objetivo de estos islotes era el de hacer estudios de proliferación, después de las 12 horas se cambió el medio de cultivo a 5.5mM glucosa por medio de cultivo a 11,1mM de glucosa y así se mantuvo. Si por el contrario estos islotes se

utilizaron para realizar estudios de secreción de insulina, se mantuvieron a 5,5mM de glucosa.

Soluciones:

- **Glucosa 1M**

1. D-(+)-Glucosa.H₂O (Merck)..... 1.981g (1M)
2. H₂O..... c.s.p. 10mL

- **Medio de cultivo de islotes**

	[] inicial	[] final	Cantidad
RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640) (sin glucosa) (Biological Industries)	-	-	500 ml
FBS (Invitrogen)	-	10%	57,2 ml
Penicilina / estreptomicina (Lonza)	5000 U/ml	50 U/ml	5,7 ml
L-Glutamina (Lonza)	200mM	2mM	5,7 ml
Solución glucosa 1M	1M	5,5mM	3,1 ml
		11,1mM	6,4 ml

6.2.2.- Infección de islotes

Se infectaron islotes provenientes de ratas Wistar con el gen *LacZ* y las isoformas de *Tmem27* para observar cómo estos genes afectaban a la proliferación y secreción de insulina inducida por glucosa.

Protocolo:

1. Aislar los islotes y dejarlos en grupos de 50 islotes en placas no adherentes de 6cm a 5,5mM glucosa durante 12 horas.
2. Pescar los islotes y ponerlos en eppendorfs.
3. Centrifugar a 200g, 5 min, 4°C.
4. Eliminar sobrenadante.

5. Resuspender en 200µl de medio de cultivo conteniendo 10^9 PFU/ml del adenovirus a estudiar.
6. Situarlos en el centro de una placa de 6cm, poniéndolos en forma de gota, evitando que la gota se extienda y se queden sin medio.
7. Incubar a 37°C, 4h.
8. Añadir 6ml de medio de cultivo.
9. Pescar los islotes y pasarlos a eppendorfs.
10. Centrifugar a 200g, 5 min, 4°C.
11. Eliminar sobrenadante.
12. Resuspender en 1ml de HBBS (*Hank's Balanced Salt Solution*, solución equilibrada de sales de Hank, Sigma).
13. Centrifugar a 200 g, 5 min, 4°C.
14. Eliminar sobrenadante.
15. Resuspender en 1 ml de medio completo.
16. Traspasar a una placa de 6 cm no adherente con 6 ml de medio.

6.2.3.- Estudios de proliferación

Para estudiar los niveles de proliferación de los islotes infectados con el gen *LacZ* o las diferentes isoformas de *Tmem27* se midió la incorporación de ^3H -metil-timidina por los islotes.

Protocolo:

1. Extraer los islotes y ponerlos en placas de 6 cm de diámetro (Sarstedt) con una densidad de 50 islotes por placa y cultivarlos a 5,5mM de glucosa.
2. A las 12 horas infectar los islotes.
3. A las 4 horas de la infección, sustituir el medio de infección por medio a 11,1mM de glucosa.

4. 24 horas más tarde, añadir hidroxurea (Sigma) a una concentración final de 12,5mM, con tal de sincronizar las células en el mismo punto del ciclo celular (fase S).
5. 24 horas más tarde, pescar los islotes y ponerlos en eppendorfs.
6. Centrifugar a 200g, 5 min, 4°C.
7. Eliminar sobrenadante.
8. Añadir 1ml de HBSS por eppendorf para eliminar la hidroxurea.
9. Centrifugar a 200g, 5 min, 4°C.
10. Extraer el HBSS.
11. Añadir 1ml de HBSS por eppendorf para eliminar la hidroxurea.
12. Centrifugar a 200g, 5 min, 4°C.
13. Extraer el HBSS.
14. Añadir 1ml de HBSS por eppendorf para eliminar la hidroxurea.
15. Centrifugar a 200g, 5 min, 4°C.
16. Extraer el HBSS.
17. Resuspender en 2 ml de medio de cultivo suplementado con 10µCi/ml de ³H-metil-timidina (actividad específica inicial de 74 GBq/mmol, GE Healthcare).
18. A las 4 horas, contar, pescar los islotes y ponerlos en eppendorfs.
19. Centrifugar a 200g, 5 min, 4°C.
20. Eliminar sobrenadante.
21. Añadir 1ml de HBSS por eppendorf para eliminar la ³H-metil-timidina no incorporada.
22. Centrifugar a 200g, 5 min, 4°C.
23. Extraer el DPBS.
24. Congelar los islotes.
25. Descongelar.

26. Añadir 250µl de agua.
27. Sonicar los islotes, durante 10seg a 10W (muestras en hielo).
28. Poner 50µl de los islotes sonicados en un eppendorf y añadir 500µl de ácido tricloroacético (Sigma) al 5% en agua frío y homogenizar pipeteando.
29. Filtrar el contenido de cada eppendorf por un filtro de fibra de vidrio (*Glass microfibre filter*, Whatman) con la ayuda de un sistema de vacío (Sampling manifold, Millipore).
30. Añadir 1ml de agua para lavar y aspirar.
31. Añadir 1ml de agua para lavar y aspirar.
32. Añadir 1ml de agua para lavar y aspirar.
33. Recoger los filtros y ponerlos en viales de centelleo junto con 10ml de líquido de centelleo (Perkin Elmer).
34. Leer con un analizador de líquido de centelleo Tri-carb 2300TR (Perkin Elmer Packard).
35. Normalizar las cpm (cuentas por minuto) por el número de islotes contabilizados.

6.2.4.- Estudios de secreción de insulina

Los estudios de secreción de insulina se realizaron, o bien tras extraer los islotes (en el caso de los animales sanos tratados y no tratados con tungstato de sodio), o bien tras sobreexpresar el gen *LacZ* o diferentes isoformas de *Tmem27* (pasadas 48h desde la infección).

Protocolo:

1. Pescar 8 islotes y ponerlos en un vial de secreción (tubo cónico de 2ml), en el que hay 1 ml de solución de secreción sin glucosa (realizar triplicados por condición).
2. Introducir el vial de secreción en un vial de centelleo de 25 ml y cerrar con el tapón de rosca.

3. Introducir los viales de centelleo en una gradilla y situarlos en un baño a 37°C, con agitación lenta (con poca agua para evitar que floten los viales).
4. Incubar 30 min a 37°C.
5. Abrir el vial de centelleo, sacar el vial de secreción y ponerlo en hielo.
6. Extraer el medio de secreción sin arrastrar los islotes con la ayuda de una lupa binocular.
7. Añadir 1 ml de solución de secreción suplementada con glucosa (concentración final de 2,2 o 16,7mM).
8. Introducir el vial de secreción en el vial de centelleo y ponerlo en una gradilla.
9. Incubar 90 min a 37°C en el baño a agitación lenta.
10. Recoger el medio de secreción sin arrastrar los islotes con la ayuda de una lupa binocular y congelar.
11. Congelar el vial tapado con parafilm (Pechiney Plastic Packaging).

Con el medio de secreción recogido se mide la insulina secretada (dilución 1:5 para las muestras a 2.2mM y de 1:10 para las muestras de 16,7mM) y con las células congeladas se observa la cantidad de DNA por pocillo.

Soluciones:

Las mismas que se utilizan para estudiar la secreción de insulina en células.

6.3.- Cultivos primarios: células tubulares proximales

Se utilizaron cultivos primarios de células tubulares provenientes de riñones de ratones FVB (Taconic Farms) (se denominan así por qué se demostró que eran sensibles a *Friend leukemia virus B*, virus de la leucemia amiga B). Estos cultivos primarios fueron aislados en la Unidad de Transplante Renal del Hospital Clínico de Barcelona por la Dra. María José Ramírez y se obtienen a través de una disgregación mecánica y enzimática de la médula del riñón y posterior separación en un gradiente de Percoll (Amersham).

6.3.1.- Cultivo de células tubulares proximales

El cultivo se realizó con un medio preparado en la Unidad de Transplante Renal que no contiene suero bovino fetal, hecho que evita que crezcan fibroblastos que podrían estar contaminando la muestra y cuyo ratio de crecimiento es mucho mayor a las células tubulares proximales. Además, el hecho que no contuviera suero bovino fetal facilitó la recogida del medio y su posterior análisis de la escisión de Tmem27, sin necesidad de cambiar el medio de cultivo.

Este cultivo celular se puede pasar por tripsinización (protocolo idéntico al utilizado en las líneas celulares), habiéndose trabajado en este estudio en los pases del 5 al 10.

Soluciones:

- Medio de cultivo de células tubulares proximales

	[] final
DMEM/Ham's F12 (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> , medio de águila modificado por Dulbecco) (Sigma)	-
Prostaglandina E1 (Sigma)	25ng/ml
Selenio (Sigma)	5ng/ml
Apo-transferrina (Sigma)	5µg/ml
EGF (<i>epidermal growth factor</i> , factor de crecimiento de epidermis) (Sigma)	10ng/ml
Hidrocortisona (Sigma)	18ng/ml
Tri-iodotironina (Sigma)	3,3µg/ml
Insulina (Sigma)	5µg/ml
Amfotericina (Biological Industries)	2,5µg/ml
Penicilina / Estreptomicina (Biological Industries)	50U / 50 µg/ml

6.3.2.- Infección de células tubulares proximales

Para el estudio de la escisión de *Tmem27* en las células tubulares proximales, se infectaron estas células con el adenovirus que codificaba para *Tmem27* y β -galactosidasa.

Protocolo: (ej. pocillo de una placa de 6 pozos)

1. Sembrar las células en los pocillos de la placa de 6 pozos.
2. Crecer hasta que lleguen a confluencia.
3. Extraer el medio de cultivo de las células.
4. Añadir 1,1ml de lisado de adenovirus ($\sim 1,39 \cdot 10^9$ PFU).
5. Incubar 1,5 horas a 37°C.
6. Extraer el medio de cultivo de las células.
7. Añadir medio de cultivo sin adenovirus.

7.- ESTUDIOS CON MODELOS ANIMALES

Todos los estudios aquí descritos fueron autorizados por el comité ético de la Universidad de Barcelona.

7.1.- Inducción de diabetes en ratas

El primer trabajo descrito en esta tesis se basa en los efectos del tungstato sobre el páncreas de ratas diabéticas.

Protocolo:

Las ratas de la cepa Wistar, con un peso inicial de 225-250 g, se adquirieron a Charles River. Tras estar una semana estabuladas (para disminuir el estrés del viaje), se procedió a inducirles diabetes por una única inyección intraperitoneal de una solución de estreptozotocina a una dosis de 70mg de estreptozotocina/Kg de peso animal (esta dosis de estreptozotocina da lugar a una destrucción selectiva del 80-90% de las células beta pancreáticas). Teniendo en cuenta que se trabajó con una solución que

contenía 70mg/ml de estreptozotocina, se inyectó (mediante una jeringuilla con una aguja de 30G) a una dosis de ml de solución/Kg de peso.

Al cabo de una semana se monitoreó la glicemia, considerando que el experimento había ido correctamente si las oncentraciones eran superiores a 400mg/dl.

En el caso de los animales control (denominados como “sanos”), se administró tan sólo el vehículo de disolución (tampón citrato).

Soluciones:

- **Tampón citrato 100mM, pH 4,5**

1. Citrato trisódico dihidratado (Fluka)..... 2.941g
2. H₂O 100ml

Ajustar con HCl a pH 4,5.

Filtrar con un filtro de 0,22µm en campana de flujo laminar vertical.

- **Solución de estreptozotocina**

1. Streptozotocina (Sigma)..... 70mg
2. Tampón citrato 100mM, pH 4,5 1ml

La estreptozotocina debe ser conservada a -20°C.

La estreptozotocina es un potente tóxico, con lo que deben extremarse las precauciones al manipularla (guantes, mascarilla, bata, etc.).

La solución debe ser preparada momentos antes de su inyección.

7.2.- Administración de tungstato

Una semana tras la inyección de estreptozotocina, se inició el tratamiento de los animales con tungstato de sodio (Carlo Erba). Este tratamiento consistía en sustituir el agua de bebida por agua destilada con tungstato de sodio a una dosis de 2g/l, permitiendo el acceso libre hasta la saciedad (*ad libitum*). El uso de agua destilada era

imprescindible, ya que en agua no destilada el tungstato de sodio precipita a la dosis administrada. Este tratamiento fue administrado a un subgrupo de animales diabéticos y a un subgrupo de animales no diabéticos, el resto de animales se les administró el vehículo de disolución (agua destilada).

7.3.- Administración de floricina

La floricina es un inhibidor renal de la absorción activa de glucosa. Al administrarla provoca una disminución de la glucemia por una eliminación de la glucosa por vía urinaria.

Protocolo:

La floricina se administró a ratas diabéticas Wistar una semana después de haberles inducido la diabetes y con glucemias superiores a 400mg/dl. Se administró cada 8 horas por vía subcutánea durante 1 semana a una dosis de 2g/Kg.día (equivalente a 0,66g/Kg cada 8 horas).

Además, debido a que las glucemias de los animales eran muy elevados (superiores a 600mg/dl), se sometió a los animales a una restricción calórica administrándoles 0,1g de pienso/Kg de animal diario (administrados a las 00:00 cada día), tal como se realiza en otros estudios similares en los que se administra floricina [104].

Soluciones:

- **Solución de floricina**

1. Floricina (Aldrich)5g
2. Propilenglicol (Sigma).....c.s.p. 12,5ml

La solución debe ser preparada antes de su inyección y no debe ser conservada por un largo tiempo, ya que se oxida y se vuelve más anaranjada. La solución debe ser conservada en un recipiente opaco (es fotosensible) e idealmente en una atmósfera de nitrógeno (para reducir su oxidación).

Esta solución requiere un largo tiempo de agitación (1 hora aproximadamente), ya que la floricina es de difícil disolución.

7.4.- Toma de muestras de sangre

7.4.1.- Capilar

Se utilizó para determinar la glucemia o insulinemia en el monitoreo general y en los tests de tolerancia intraperitoneal a la glucosa y sensibilidad a la insulina.

Protocolo:

1. Realizar un pequeño corte transversal en la parte más distal de la cola ($\leq 1\text{mm}$).
2. Masajear la cola para extraer una gota de sangre para observar la glucemia con un Accu-Check (Roche) o extraer el volumen suficiente ($\sim 50\mu\text{l}$) con la ayuda de un microvette (Sarstedt) (tubo capilar con EDTA) para poder valorar la insulinemia.
3. Centrifugar los tubos capilares microvette a $3500g$, 4°C , 15min , para separar los eritrocitos, leucocitos y plaquetas.
4. Recoger el plasma sin arrastrar el pellet y guardarlo congelado.

7.4.2.- Total

Se utilizó para observar la insulinemia al final del tratamiento y obtener suero para ver sus efectos sobre la proliferación y fosforilación de MAPK en células INS-1-E.

Protocolo:

1. Anestesiarse a la rata introduciéndola en la parte superior de un desecador en cuya parte inferior contiene isofluorano (Abbot).
2. Comprobar que está dormida.
3. Proceder a su decapitación, antes que muera, para que el corazón le siga latiendo.
4. Recoger con un tubo Vacutaineer (Becton Dickinson) abierto que contiene sílice y un gel que permite separar el coágulo del suero.
5. Mezclar por inversión.

6. Dejar coagulándose unos 30min a 4°C.
7. Centrifugar a 13000g, 10min, 4°C.
8. Recoger el suero sin arrastrar el coágulo y congelar.

7.5.- Test de tolerancia intraperitoneal a la glucosa

Con este test se valora principalmente la capacidad del páncreas a secretar insulina cuando se le estimula con glucosa y la de los tejidos periféricos a captar la glucosa en sangre hasta llegar a valores de normogluceemia.

Protocolo:

1. Retirar a las ratas la comida durante 6 horas.
2. Inyectar por vía intraperitoneal glucosa, en forma de glucosa al 40% (suero glucosado hipertónico al 40%, Fresenius Kabi) a dosis de 2g glucosa/Kg animal.
3. Medir glucemia con un Accu-Check (Roche) y tomar muestras de sangre capilar con un Microvette (Sarstedt) a los 0, 15, 30, 60 y 120 min.

7.6.- Test de sensibilidad intraperitoneal a la insulina

Con este test se valora principalmente la capacidad de los tejidos periféricos a absorber la glucosa circulante por la acción de la insulina.

Protocolo:

1. Retirar a las ratas la comida durante 6 horas.
2. Inyectar por vía intraperitoneal insulina rápida (Actrapid, Novo Nordisk) a dosis de 1 UI/Kg animal.
3. Medir glucemia con un Accu-Check (Roche) a los 0, 15, 30, 60 y 120 min.

7.7.- Aislamiento de islotes de rata

Los islotes se han aislado tanto para observar los niveles de ciertos genes en los animales tratados y no tratados con tungstato como para la sobreexpresión de las isoformas de Tmem27 y la observación de cómo afectan sobre su proliferación y secreción de insulina estimulada por glucosa.

Protocolo:

1. Preparar un desecador, en el que en el compartimiento inferior se sitúe un trozo de papel impregnado en isofluorano (Abbot).
2. Introducir la rata en el compartimiento superior del desecador, hasta que pierda el conocimiento.
3. Comprobar que el animal está anestesiado y decapitarlo con una guillotina, procurando que se desangre.
4. Rociar con etanol 70% el abdomen de la rata para que los pelos queden juntos y a la hora de hacer las incisiones no interfieran.
5. Situar al animal en decúbito supino, dejándolo de forma que la cola del animal quede en la parte más distal.
6. Abrir la cavidad peritoneal y apartar los órganos hasta localizar el conducto biliar común (también llamado colédoco).
7. Clampar el colédoco en su parte más distal, en contacto con el intestino.
8. Realizar un pequeño corte en la parte proximal del colédoco (parte más cercana al hígado) e insertar una cánula biselada de plástico (diámetro externo 0,96mm, diámetro interno 0,58mm [Smiths]), unida a una jeringuilla de 23G.
9. Inyectar 20ml de una solución de colagenasa, observando que el páncreas se hincha.
10. Extraer el páncreas y situarlo en una placa de Petri (Soria Genlab).
11. Quitar la grasa y nódulos linfáticos que lo acompañan.
12. Depositar el páncreas en un bote de recogida de orina de 100ml (Deltalab), con 5ml de la solución de colagenasa, poniendo como máximo 2 páncreas por bote.
13. Situar los botes en un baño a 37°C en agitación moderada durante 20min.
14. Situar los botes en hielo.
15. Homogenizar el contenido de los botes con una pipeta de plástico Pasteur (Deltalab).

16. Añadir 20ml de solución Hank's-BSA fría.
17. Dejar precipitar.
18. Eliminar sobrenadante por decantación, sin apurar en exceso.
19. Añadir 20ml de solución Hank's-BSA fría.
20. Dejar precipitar.
21. Eliminar sobrenadante por decantación, dejando al menos unos 10ml.
22. Homogenizar con una jeringuilla de 14G.
23. Filtrar por a través de un colador de forma que el filtrado pasa a un tubo tipo falcon de 50ml.
24. Añadir 20ml de solución Hank's-BSA fría.
25. Centrifugar a 200g y 4°C durante 5 min.
26. Eliminar el sobrenadante.
27. Resuspender en 10ml de Histopaque (Sigma) con densidad 1,119g/l.
28. Añadir, con mucho cuidado de no romper las fases, 10ml de Histopaque (Sigma) con densidad 1,077g/l.
29. Añadir, con mucho cuidado de no romper las fases, 10ml de solución Hank's-BSA fría.
30. Centrifugar a 1000g y 11°C durante 20 min.
31. Recoger la interfase y pasarlo a un falcon de 50ml.
32. Añadir 20ml de solución Hank's-BSA fría.
33. Centrifugar a 200g y 4°C durante 5 min.
34. Eliminar el sobrenadante.
35. Resuspender en 20ml de solución Hank's-BSA fría.
36. Proceder a la pesca de los islotes con la ayuda de una lupa binocular, distinguiendo a los islotes por su forma esférica, color blanco y al iluminarlos presentar un borde refringente.

Soluciones:

- **Solución de colagenasa (por rata)**

1. Colagenasa P (Roche)25mg
2. HBSS.....25ml

Esta solución se debe preparar antes de proceder al aislamiento de los islotes y se debe descartar lo que sobre. Una vez preparadas se debe conservar en hielo.

- **Solución Hank's-BSA**

1. BSA (Sigma).....0,5g
2. HBSS (Sigma).....500ml

Esta solución se puede preparar con antelación y conservarla a 4°C.

8.- INMUNOHISTOQUÍMICA

Para observar donde se localiza Tmem27 dentro del páncreas y de los riñones, se utilizaron técnicas de detección por inmunohistoquímica.

8.1.- Fijación de tejidos

Para conservar la estructura morfológica de los tejidos, éstos se fijan con formaldehído (sustancia muy reactiva por el grupo aldehído que permite establecer muchas uniones covalentes) y se empotran en parafina, lo que permite realizar cortes del tamaño necesario para realizar la inmunohistoquímica.

Protocolo:

1. Extraer el tejido.
2. Rápidamente situarlo en un vial de centelleo de 25ml con formaldehído al 4% (Sigma) o formalina al 10% (Sigma).
3. Dejarlo 12h a 4°C.
4. Quitar el formaldehído por decantación y añadir etanol (Panreac) al 50%.
5. A los 20min, quitar el etanol al 50% por decantación y añadir etanol al 50%.
6. A los 20min, quitar el etanol al 50% por decantación y añadir etanol al 50%.
7. A los 20min, quitar el etanol al 50% por decantación y añadir etanol al 70%.
8. A los 20min, quitar el etanol al 70% por decantación y añadir etanol al 70%.
9. A los 20min, quitar el etanol al 70% por decantación y añadir etanol al 70%.
10. A los 20min, quitar el etanol al 70% por decantación y añadir etanol al 95%.
11. A los 20min, quitar el etanol al 95% por decantación y añadir etanol al 95%.
12. A los 20min, quitar el etanol al 95% por decantación y añadir etanol al 95%.
13. A los 20min, quitar el etanol al 95% por decantación y añadir etanol al 100%.
14. A los 20min, quitar el etanol al 100% por decantación y añadir etanol al 100%.
15. A los 20min, quitar el etanol al 100% por decantación y añadir etanol al 100%.

16. A los 20min, quitar el etanol al 100% por decantación y añadir xilol (Panreac).
17. A los 20min, quitar el xilol por decantación y añadir xilol.
18. A los 20min, quitar el xilol por decantación y añadir xilol.
19. A los 20min, quitar el xilol por decantación y añadir una mezcla de parafina fundida (Cymit) y xilol en proporción 1:1.
20. Dejar solidificar y dejar unas 12 horas a temperatura ambiente.
21. Calentar a 65°C para que la parafina funda.
22. Quitar la parafina fundida con xilol y añadir parafina fundida, manteniendo la muestra a 65°C y la parafina fundida.
23. A la hora, quitar la parafina y añadir parafina fundida, manteniendo la muestra a 65°C.
24. A la hora, quitar la parafina y añadir parafina fundida, manteniendo la muestra a 65°C.
25. Montar los bloques de parafina utilizando moldes metálicos y casetes de inclusión.
26. Enfriar la muestra para que la parafina solidifique.

8.2.- Inmunohistoquímica de Tmem27

Protocolo:

1. Realizar cortes del tejido con una amplitud de 4µm utilizando un micrótopo.
2. Pasar las muestras a un baño de agua caliente a 40°C de forma que se estiren.
3. Recoger las muestras en un portaobjetos de vidrio tratado con poli-L-lisina.
4. Dejar secar las muestras de 1 hora a 12horas.
5. Desparafinar y rehidratar las muestras:
 - 5.1. Poner las muestras en xilol durante 20 min.
 - 5.2. Poner las muestras en xilol durante 20 min.
 - 5.3. Poner las muestras en etanol 100% durante 5 min.

- 5.4. Poner las muestras en etanol 95% durante 5 min.
- 5.5. Poner las muestras en etanol 70% durante 5 min.
- 5.6. Poner las muestras en etanol 50% durante 5 min.
- 5.7. Poner las muestras en agua durante 5 min.
6. Exposición antigénica (*antigen retrieval*):
 - 6.1. Poner las muestras en una cubeta de 350ml de capacidad con 300ml de solución de citrato.
 - 6.2. Calentar las muestras en un microondas hasta que comiencen a formarse pequeñas burbujas (sin que llegue a hervir completamente). Por ejemplo, en un microondas (Candy, CMG 1773DW) (hay que abrir la puerta del microondas para que se enfríe ligeramente entre paso y paso):
 1. 100W, 30seg.
 2. 80W, 30seg.
 3. 50W, 30seg.
 4. 30W, 30seg.
 5. 10W, 30seg.
 6. 30W, 30seg x 4.
 - 6.3. Dejar enfriar en el mismo tampón durante 20 min.
 - 6.4. Pasar las muestras a una cubeta con PBS (*Phosphate Buffered Saline*, tampón salino de fosfatos, Roche), dejar 5min.
 - 6.5. Sustituir el PBS por PBS nuevo, dejar 5min.
7. Permeabilización:
 - 7.1. Sustituir el PBS por PBS con Triton X-100 al 1%, dejar 30min a temperatura ambiente.
 - 7.3. Sustituir el PBS con Triton X-100 por PBS nuevo, dejar 5min.
 - 7.4. Sustituir el PBS por PBS nuevo, dejar 5min.

7.5. Sustituir el PBS por PBS nuevo, dejar 5min.

8. Bloqueo:

8.1. Quitar el exceso de PBS del portaobjetos, sin que se seque la muestra.

8.2. Delimitar la muestra con una solución hidrófoba (Dakopen, Dako).

8.3. Añadir a cada muestra suero de burro al 3%, diluida en solución diluyente de anticuerpo (Dako) y dejar 1 hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda.

8.4. Sustituir el suero de burro al 3% por PBS nuevo, dejar 5min.

8.5. Sustituir el PBS por PBS nuevo, dejar 5min.

8.6. Sustituir el PBS por PBS nuevo, dejar 5min.

9. Anticuerpo primario:

9.1. Quitar el exceso de PBS del portaobjetos, sin que se seque la muestra.

9.2. Diluir los anticuerpos primarios en solución diluyente de anticuerpo (Dako) y añadir a las muestras. Dejar 12 horas a 4°C en una cámara húmeda.

Diluciones de los anticuerpos utilizadas:

- Tmem27 (Alexis, hecho en ratón): 1/50.
- Insulina (Dako, hecho en cobaya): 1/500.
- Glucagón (Linco, hecho en cobaya): 1/2000.
- Glucagón (Dako, hecho en conejo): 1/20.
- Somatostatina (Dako, hecho en conejo): 1/200.
- Polipéptido pancreático (ICN, hecho en conejo): 1/50.

9.3. Sustituir el anticuerpo primario por PBS nuevo, dejar 5min.

9.4. Sustituir el PBS por PBS nuevo, dejar 5min.

9.5. Sustituir el PBS por PBS nuevo, dejar 5min.

10. Anticuerpo secundario:

- 10.1. Quitar el exceso de PBS del portaobjetos, sin que se seque la muestra.
- 10.2. Diluir los anticuerpos secundarios en solución diluyente de anticuerpo (Dako) y añadir a las muestras. Dejar 3 horas a temperatura ambiente en una cámara húmeda.

Diluciones de los anticuerpos utilizadas:

- Anti-IgG de cobaya-AMCA (Jackson ImmunoResearch, hecho en burro): 1/100.
- Anti-IgG de conejo-Cy2 (Jackson ImmunoResearch, hecho en burro): 1/500.
- Anti-IgG de ratón-Cy3 (Jackson ImmunoResearch, hecho en burro): 1/500.

10.3. Sustituir el anticuerpo primario por PBS nuevo, dejar 5min.

10.4. Sustituir el PBS por PBS nuevo, dejar 5min.

10.5. Sustituir el PBS por PBS nuevo, dejar 5min.

11. Montaje:

11.1. Quitar el exceso de PBS del portaobjetos, sin que se seque la muestra.

11.2. Añadir a la muestra solución de Mowiol.

11.3. Poner un cubreobjetos encima de la muestra.

11.4. Presionar para eliminar las burbujas que se hayan podido quedar entre el cubreobjetos y el portaobjetos.

11.5. Sellar con laca de uñas.

Soluciones:

- **Solución de citrato trisódico 10mM, pH6,0**

1. Citrato trisódico (Fluka)0,88g (10mM)

2. Agua300ml

Ajustar el pH con HCl a 6,0

- **PBS-Tritón-X100 1%**

1. Agua99ml
2. Tritón-X100 (Sigma).....1ml

- **Mowiol**

1. Añadir en un vaso de precipitados:
 - 1.1. Mowiol 4-88 (Calbiochem).....7,2g
 - 1.2. Glicerol (Carlo Erba)14,3ml
2. Mezclar con un agitador magnético durante 1 hora a temperatura ambiente.
3. Añadir 18ml de agua destilada.
4. Mezclar con un agitador magnético durante 2 horas a temperatura ambiente.
5. Añadir 36ml de 0,2M de Tris(hidroximetil)aminometano pH 8,5.
6. Mezclar con un agitador magnético durante 2 horas a 50°C.
7. Centrifugar a 5000g, 15 min.
8. Alicuotar y congelar a -20°C.

- **Portaobjetos tratados con poli-L-lisina**

1. Preparar poli-L-lisina al 0,01%:
 1. Poli-L-lisina al 0,1% (Sigma)30ml
 2. H₂O.....270ml
2. Sumergir portaobjetos de vidrio limpios en una cubeta con la solución de poli-L-lisina al 0,01%, dejándolos 5 min.
3. Extraer los portaobjetos de la cubeta y dejarlos secar durante 12 horas a temperatura ambiente.

9.- PROTEÍNAS

En este estudio se han observado como cambian los niveles de fosforilación de las proteínas ERK p42/p44 en células INS-1-E tratadas con tungstato de sodio y con el suero de las ratas de los diferentes grupos experimentales y se ha observado las modificaciones posttranscripcionales de Tmem27.

9.1.- Extracción de proteínas

Protocolo:

1. Lavar el material de partida:
 - A. Células en cultivo:
 - 1.1. Extraer el medio de cultivo.
 - 1.2. Añadir DPBS para cubrir la placa o flascón.
 - 1.3. Extraer el DPBS.
 - 1.4. Añadir DPBS para cubrir la placa o flascón.
 - 1.5. Extraer el DPBS.
 - 1.6. Congelar las células.
 - B. Islotes:
 - 1.1. Pescar los islotes y situarlos en un eppendorf.
 - 1.2. Centrifugar a 200g, 5 min, 4°C.
 - 1.3. Eliminar sobrenadante.
 - 1.4. Resuspender en 1ml de HBBS.
 - 1.5. Centrifugar a 200g, 5 min, 4°C.
 - 1.6. Eliminar sobrenadante.
 - 1.7. Congelar los islotes.
2. Descongelar la muestra en hielo.

3. Añadir suficiente tampón de lisis (por ejemplo: islotes, entre 50 y 100µl; células sembradas en un pozo de una placa de 6 pocillos, 100µl).
4. Lisar las células con un raspador (scraper) y traspasar el tampón de lisis a un eppendorf. En el caso de los islotes, lisarlos haciéndolos pasar por una jeringuilla de insulina (0,5ml) unida a una aguja de 30G.
5. Congelar el eppendorf con el extracto proteico a -20°C.
6. Descongelar el eppendorf a 37°C.
7. Congelar el eppendorf con el extracto proteico a -20°C.
8. Descongelar el eppendorf a 37°C.
9. Congelar el eppendorf con el extracto proteico a -20°C.
10. Descongelar el eppendorf a 37°C.
11. Dejar la muestra 30 min en hielo.
12. Centrifugar la muestra a máximas revoluciones durante 20 min a 4°C (por ejemplo 20800g en una centrífuga refrigerada Eppendorf 5417R).
13. Recoger sobrenadante y traspasarlo a un nuevo eppendorf.

Soluciones:

- **Ortovanadato sódico activado**

1. Preparar ortovanadato 200mM en agua a pH 10:

1.1. Ortovanadato sódico (Sigma) 736mg

1.2. H₂O..... 20ml

Ajustar a pH 10, observando una solución amarillenta.

2. Hervir la solución hasta que se vuelva incolora (unos 10 min).
3. Enfriar hasta temperatura ambiente.
4. Ajustar a pH 10.

5. Repetir pasos 2-4 hasta que la solución permanezca incolora y el pH se mantenga a 10.

- **Tampón de lisis**

1. Tris(hidroximetil)aminometano (Serva).. 605mg (50mM)
2. Na₂EDTA.2H₂O (Sigma)186mg (5mM)
3. NaCl (Serva).....870mg (150mM)
4. Triton X-100 (Sigma)1ml (1%)
5. NaH₂PO₄142mg
6. NaF42mg
7. H₂O99ml

Ajustar el pH a 7,5.

Alicuotar y guardar a -20°C.

En el momento de su utilización preparar (por ejemplo para 100µl):

1. Solución alicuotada.....89µl
2. Cóctel inhibidor de proteasas (Sigma) (10x) 10µl
3. Solución de ortovanadato activada1µl

9.2.- Valoración de proteínas

El método que aquí se describe es el ensayo de proteínas Bio-Rad DC el cual es una modificación realizada por la casa comercial Bio-Rad del método Lowry. Cabe comentar que existen otros métodos de valoración de proteínas y su elección depende de las incompatibilidades entre los reactivos del método de valoración y ciertos compuestos presentes en la sustancia a valorar y su sensibilidad.

Protocolo:

1. Preparar una curva estándar de BSA (albúmina de suero bovino, BSA) diluida en agua a concentraciones de 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 y 1mg/ml.
2. Añadir (en este orden) a una placa de 96 pocillos transparente:

- 2.1. Muestras o curva estándar 5 μ l
- 2.2. Solución A + S..... 25 μ l
- 2.3. Solución B 200 μ l

Las muestras y la curva estándar se deben poner en triplicado.

- 3. Leer la absorbancia a 750nm utilizando un espectrofotómetro de placa.
- 4. Realizar una recta de regresión con la curva estándar y calcular los valores de las muestras.

Solución:

- **Solución A + S (para 1ml)**

- 1. Solución A 980 μ l
- 2. Solución S..... 20 μ l

9.3.- Concentración de proteínas

9.3.1.- Concentración de proteínas por columnas

Para observar cómo Tmem27 era escindido desde la membrana citoplasmática al espacio extracelular, se cogió el medio de cultivo de las células cultivadas sin FBS (suero bovino fetal) y se concentró con la ayuda de microcones (Millipore).

Protocolo:

- 1. Situar 500 μ l del medio a concentrar en un microcon Ultracel YM10 (Millipore).
- 2. Centrifugar a 14000g, 30min, 25°C.
- 3. Descartar el eluyente.
- 4. Repetir pasos 1-3 hasta que se concentre todo el medio de cultivo de interés (generalmente unos 3ml) en 10-20 μ l.
- 5. Invertir el microcon, cambiar el eppendorf receptor y realizar una centrifugada breve para recuperar el concentrado.

9.3.2.- Concentración de proteínas por precipitación en acetona

Para realizar estudios posttranscripcionales, se procedió a precipitar el extracto proteico necesario con acetona, de forma que el tampón en el que estaban solubilizadas las proteínas se sustituía por el adecuado para realizar el correspondiente estudio, evitando así posibles incompatibilidades entre los enzimas y los tampones.

Protocolo:

1. Añadir a un eppendorf:
 - 1.1. Proteínac.s.p. realizar el estudio
 - 1.2. Acetona (Panreac) 5 veces el volumen de proteína
2. Incubar 20 min a -80°C.
3. Centrifugar a máximas revoluciones (por ejemplo 20800g en una centrífuga refrigerada Eppendorf 5417R) a 4°C durante 15 min.
4. Extraer sobrenadante.
5. Centrifugar a máximas revoluciones (por ejemplo 20800g en una centrífuga refrigerada Eppendorf 5417R) a 4°C durante 30 seg.
6. Acabar de extraer el sobrenadante.
7. Dejar secar a temperatura ambiente.
8. Redisolver el pellet en el tampón adecuado.

9.4.- Estudios de fosforilación

Para observar si Tmem27 estaba fosforilado se procedió a desfosforilar todo el extracto proteico y comprobar si había variaciones de peso molecular en un Western Blot tras el tratamiento.

Protocolo:

1. Proteína precipitada por acetona.....50µg
2. Tampón de CIAP (*calf intestinal alkaline phosphatase*, fosfatasa alcalina de intestino de becerro) (10x)..... 3µl

- | | |
|------------------------------|-------------------|
| 3. CIAP (20U/ μ l) | 0,5 μ l (10U) |
| 4. H ₂ O..... | 26,5 μ l |

Incubar 1 hora a 37°C.

9.5.- Estudios de heparinización

Para observar si Tmem27 estaba heparinizado se procedió a desheparinizar todo el extracto proteico y comprobar si había variaciones de peso molecular en un Western Blot tras el tratamiento.

Protocolo:

- | | |
|---|-------------------|
| 1. Proteína precipitada por acetona..... | 50 μ g |
| 2. Tampón de heparinasa | 10 μ l |
| 3. Heparinasa (0,5U/ μ l) (Sigma) | 15 μ l (7,5U) |

Incubar 12 horas a temperatura ambiente.

Soluciones:

- **Tampón de heparinasa**

- | | |
|---|---------------|
| 1. Tris(hidroximetil)aminometano (Serva) | 242mg (20mM) |
| 2. NaCl (Serva) | 292mg (50mM) |
| 3. CaCl ₂ .2H ₂ O (Sigma) | 59mg (4mM) |
| 4. BSA (Sigma)..... | 0,01g (0,01%) |
| 5. H ₂ O..... | 100ml |

9.6.- Estudios de glicosilación

Para observar si Tmem27 estaba glicado se procedió a desglicosilar todo el extracto proteico y comprobar si había variaciones de peso molecular en un Western Blot tras el tratamiento.

Protocolo:

1. Precipitar 50 μ g de la proteína a examinar con acetona.

2. Resuspender el precipitado en 20 μl de tampón de desglicosilación.
3. Calentar las muestras a 95°C, 5 min.
4. Centrifugar a máximas revoluciones (por ejemplo 20800g en una centrífuga refrigerada Eppendorf 5417R) a 4°C durante 30 seg.
5. Añadir 2 μl de tritón X-100 al 10% en agua (concentración final 1%).
6. Añadir N-glicosidasa u O-glicosidasa o ambas, según queramos eliminar N-glicanos, O-glicanos o ambos.
 - 6.1. N-glicosidasa F (Roche) (1U/ μl)2 μl (2U)
 - 6.2. O-glicosidasa (Roche) (0,5mU/ μl).....5 μl (2,5mU)
7. Incubar a 37°C durante 12 horas.

9.7.- Electroforesis de proteínas

Para separar las proteínas por su peso molecular se las electroeluyó en un gel de acrilamida, técnica denominada como SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico).

Protocolo:

1. Lavar los vidrios de la MiniProtean (Bio-Rad) con agua y acetona, dejándolos secar.
2. Montar los vidrios.
3. Añadir la fase resolutive hasta 2 cm por debajo del límite inferior de los pocillos.
4. Añadir butanol (Carlo Erba) saturado en agua (1:1) para recubrir la superficie del gel de forma que se eliminen las burbujas formadas, se alinee la superficie y se impida la inhibición de la polimerización por el oxígeno atmosférico.
5. Dejar polimerizar (20-40 min).
6. Inclinar los vidrios para eliminar el butanol y arrastrar lo que quede de butanol con un papel 3MM Chr (Whatman).

7. Añadir la fase de apilamiento y rápidamente poner el peine formador de pocillos.
8. Dejar polimerizar (10 min).
9. Quitar el peine formador de pocillos y situar el gel con los vidrios dentro de la cubeta de la MiniProtean.
10. Añadir a la cubeta tampón de transferencia 1x.
11. Preparar las muestras:
 - 11.1. Añadir a 50µg de proteína cantidad suficiente de tampón de carga Laemmli 4x.
 - 11.2. Calentar las muestras a 95°C, 5 min, para su desnaturalización.
 - 11.3. Mantener las muestras en hielo hasta su carga.
12. Cargar las muestras en los pocillos del gel.
13. Cerrar la MiniProtean y someter el gel a un voltaje constante de unos 120V durante 1-2 horas (hasta que el frente de las muestras esté a punto de escaparse del gel).

Soluciones:

- **Fase resolutive**

Gel de tamaño de poro pequeño para separar las proteínas por su peso molecular.

1. Gel pequeño de 10 ml al 12% para observar Tmem27 en las células y tejidos:
 - 1.1. H₂O.....3.3ml
 - 1.2. Acrilamida/Bis-acrilamida al 29/1% (Bio-Rad).....4ml
 - 1.3. Tris(hidroximetil)aminometano (Serva) 1.5M pH 8,8 en agua... 2,5ml
 - 1.4. SDS (Serva) al 10% en agua0,1ml
 - 1.5. Persulfato amónico (Sigma) al 10% en agua0,1ml
 - 1.6. TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina).0,004ml

2. Gel pequeño de 10 ml al 15% para observar Tmem27 en el medio de cultivo las células:

- 2.1. H₂O.....2,3ml
- 2.2. Acrilamida/Bis-acrilamida al 29/1% (Bio-Rad).....5ml
- 2.3. Tris(hidroximetil)aminometano (Serva) 1,5M pH 8.8 en agua...2,5ml
- 2.4. SDS (dodecilsulfato sódico) (Serva) al 10% en agua.....0,1ml
- 2.5. Persulfato amónico (Sigma) al 10% en agua0,1ml
- 2.6. TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina)0,004ml

- **Fase de apilamiento**

Gel de tamaño de poro grande que permite recubrir las proteínas con SDS, cargándolas y concentrándolas. Volumen adecuado para recubrir los anteriores geles.

1. H₂O.....2,1ml
2. Acrilamida/Bis-acrilamida al 29/1% (Bio-Rad).....0,5ml
3. Tris(hidroximetil)aminometano (Serva) 1,0M pH 6,8 en agua.....0,38ml
4. SDS (dodecilsulfato sódico) (Serva) al 10% en agua0,03ml
5. Persulfato amónico (Sigma) al 10% en agua0,03ml
6. TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina).....0,003ml

- **Tampón de electroforesis (running buffer) 10x**

1. Tris(hidroximetil)aminometano (Serva)30g (250mM)
2. Glicina (Serva)144g (1,92M)
3. SDS (dodecilsulfato sódico) (Serva)10g (1%)
4. H₂O.....1 litro

- **Tampón de carga (Laemmli) 4x**

1. H₂O.....1,2ml
2. Tris(hidroximetil)aminometano (Serva) 1,0M pH 6,8 en agua.....2ml

3. Glicerol (Carlo Erba) 3,2ml
4. SDS (dodecilsulfato sódico) (Serva) 320mg
5. β -mercaptoetanol (Sigma) 1,6ml
6. Azul de bromofenol (Sigma) 10 μ l

9.8.- Transferencia húmeda de proteínas

Permite pasar las proteínas del gel de acrilamida a un medio más manejable como es una membrana de PVDF (Polyvinylidene Fluoride, fluoruro de polivinilideno).

Protocolo:

1. Activar una membrana de PVDF (Perkin Elmer) sumergiéndola en metanol (Panreac) durante 1 min.
2. Pasar la membrana de PVDF activada a una cubeta con tampón de transferencia.
3. Montar la transferencia con papeles 3MM Chr (Whatman), esponjas y la membrana de PVDF en una cubeta con tampón de transferencia, según la Fig. 18, procurando que no quede ninguna burbuja de aire entre las capas.

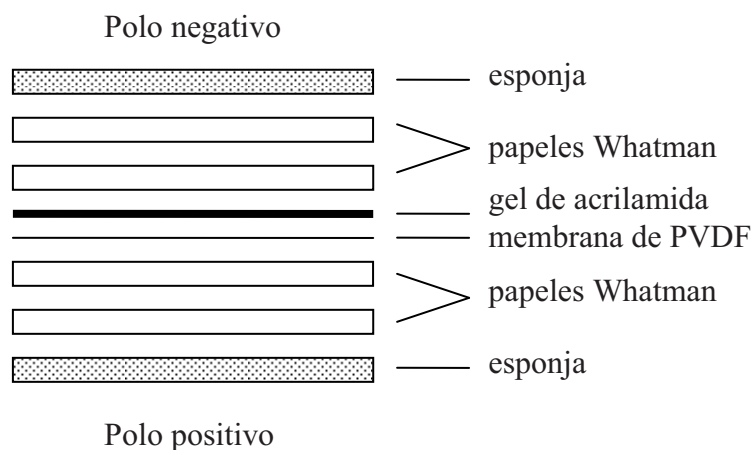


Fig. 18. Esquema de montaje de un casete de transferencia.

4. Insertar el montaje en un casete de transferencia.
5. Situar el casete dentro de una cubeta de mini TransBlot (Bio-Rad) con tampón de transferencia, teniendo mucho cuidado de orientar correctamente el casete.

6. Introducir un bloque de hielo dentro de la cubeta de transferencia.
7. Rodear la cubeta de transferencia con hielo, para evitar el recalentamiento del tampón.
8. Someter la transferencia a un amperaje constante de 400mA durante 1h 30min.
9. Desmontar la transferencia y situar la membrana de PVDF en una cubeta con TBS-T.
10. Si se hubiera secado la membrana, sumergirla 1 min en metanol.

Soluciones:

- **Tampón de transferencia**

1. Tris(hidroximetil)aminometano (Serva)3g (25mM)
2. Glicina (Serva) 14,4g (192mM)
3. Metanol (Panreac)200ml (20%)
4. H₂O 1 litro

- **TBS (Tris buffered saline, tampón salino de Tris) 20x**

1. Tris(hidroximetil)aminometano (Serva)48,45g (400mM)
2. NaCl (Serva).....175,32g (3M)
3. H₂Oc.s.p. 1 litro

Ajustar a pH 7,4 con HCl

- **TBS-T (Tris buffered saline-Tween, tampón salino de Tris con Tween)**

1. TBS 20x.....50ml
2. Tween-20 (Sigma)0,5ml
3. H₂O949,5ml

9.9.- Bloqueo de la membrana de PVDF

La fase de bloqueo permite evitar parcialmente las uniones inespecíficas del anticuerpo en la membrana. Los compuestos que se utilizan más habitualmente son la leche en polvo descremada y la albúmina de suero bovino. En este estudio se ha utilizado básicamente la albúmina de suero bovino.

Protocolo:

1. Tras realizar la transferencia, situar la membrana en TBS-T.
2. Pasar a la membrana a una cubeta con TBS-T con albúmina de suero bovino (BSA) al 5% e incubar 1 hora a temperatura ambiente y en agitación.
3. Pasar la membrana a una cubeta con TBS-T e incubar 2 min a temperatura ambiente y en agitación.
4. Pasar la membrana a una cubeta con TBS-T nuevo e incubar 2 min a temperatura ambiente y en agitación.
5. Pasar la membrana a una cubeta con TBS-T nuevo e incubar 2 min a temperatura ambiente y en agitación.

9.10.- Inmunodetección de proteínas

La membrana de PVDF contiene todo el extracto proteico. Para detectar los niveles que contiene de la proteína de interés dicho extracto, se incuba la membrana con un anticuerpo que detecta la proteína de interés. A continuación se incuba con un segundo anticuerpo que detecte el primer anticuerpo y que a su vez vaya unido a la peroxidasa de rábano picante (HRP, horseradish peroxidase). Por último, se incuba con unos reactivos (ECL, enhanced chemiluminescence, quimioluminiscencia aumentada) que en presencia de la peroxidasa emiten luz, la cual es detectada por un film fotográfico.

Protocolo:

1. Tras el bloqueo y lavado de la membrana, incubar la membrana con TBS-T BSA 5% y el anticuerpo primario a la dilución adecuada, durante 12 horas a 4°C y en agitación.

Anticuerpos y diluciones utilizadas:

- a. Anti p42/44 (ERK 1/2) (Cell signaling)1/1000
- b. Anti fosfo-p42/44 (ERK 1/2) (Cell signaling)1/1000
- c. Anti Tmem27 (Alexis)1/1000
- d. Anti c-myc, clon 9E10 (Upstate)1/1000
- e. Anti actina (Sigma).....1/500

2. Pasar la membrana a una cubeta con TBS-T e incubar 10 min a temperatura ambiente y en agitación.
3. Pasar la membrana a una cubeta con TBS-T nuevo e incubar 10 min a temperatura ambiente y en agitación.
4. Pasar la membrana a una cubeta con TBS-T nuevo e incubar 10 min a temperatura ambiente y en agitación.
5. Incubar la membrana con TBS-T BSA 5% y el anticuerpo secundario a la dilución adecuada, durante 2 horas a 4°C y en agitación.

Anticuerpos y diluciones utilizadas:

- a. Anti IgG de conejo conjugada con HRP (Amersham)1/4000
- b. Anti IgG de ratón conjugada con HRP (Amersham)1/4000

6. Pasar la membrana a una cubeta con TBS-T e incubar 10 min a temperatura ambiente y en agitación.
7. Pasar la membrana a una cubeta con TBS-T nuevo e incubar 10 min a temperatura ambiente y en agitación.
8. Pasar la membrana a una cubeta con TBS-T nuevo e incubar 10 min a temperatura ambiente y en agitación.
9. Incubar la membrana con ECL (Pierce) durante 1 min.
10. Situar la membrana en un casete junto a un film fotográfico (Fujifilm) durante el tiempo necesario para observar una señal nítida (1 seg – 10 min).
11. Revelar el film fotográfico con una reveladora (Fujifilm).

12. En caso necesario, valorar las bandas por densitometría a través del programa Image Gauge v2.0 (Fujifilm), restándoles el ruido de fondo correspondiente y expresando los valores en porcentaje respecto al control respectivo y en escala logarítmica, para obtener un señal que siga una distribución lineal y estabilizar así la varianza entre las muestras [105].

9.11.- Eliminación de los anticuerpos (stripping)

Si quisiéramos observar más de una proteína por cada membrana de PVDF, se debe eliminar los anticuerpos que hemos puesto en la anterior detección.

Protocolo:

1. Incubar la membrana en una cubeta con una solución de stripping durante 30 min a 50°C en un baño con agitación y tapada para evitar los vapores de β -mercaptoetanol.
2. Pasar la membrana a una cubeta nueva con TBS-T nuevo e incubar 5 min a temperatura ambiente y en agitación.
3. Repetir el paso 2 hasta que la membrana no huela a β -mercaptoetanol.

Soluciones:

- **Solución de stripping**

1. Tris(hidroximetil)aminometano (Serva) 1,0M pH 6,8 en agua. 3,12ml
2. SDS (dodecilsulfato sódico) (Serva) al 20% en agua..... 5ml
3. β -mercaptoetanol (Sigma) 350 μ l
4. H₂O..... 41,88ml

9.12.- Determinación de la concentración de insulina (ELISA)

Para valorar la cantidad de insulina presente en el sobrenadante de las células o en el plasma o suero de los animales, se utilizó el ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) Ultrasensitive Rat Insulin ELISA de Mercodia.

Se debería saber a priori el rango de insulina que contendran las muestras a analizar. Si no fuera así, se deben realizar varias pruebas para saber si las muestras se deben diluir en el calibrador 0 o si bien se debe añadir 50µl de muestra a cada pocillo por que hay muy poca cantidad de insulina.

Protocolo:

- 1.A. Si la muestra contiene de 0,4ug/L a 5,5 µg/L, añadir a cada pocillo de la placa:
 - 1.1. Calibrador 025µl
 - 1.2. Muestra o recta estándar (0 ;0,15 ;0,4 ;1 ;3 ;5,5 µg/l)
 en triplicado.....5µl
 - 1.3. Solución del enzima conjugado50µl
- 1.B. Si la muestra contiene de 0,02ug/L a 1,0 ug/L, añadir a cada pocillo de la placa:
 - 1.1. Muestra o recta estándar (0 ;0,02; 0,05; 0,15; 0,4; 1 µg/l)
 en triplicado.....50µl
 - 1.2. Solución del enzima conjugado50µl
2. Tapar la placa con un parafilm y mantener en agitación suave durante 2 horas a temperatura ambiente.
3. Añadir 350µl de tampón de lavado a cada pocillo.
4. Eliminar contenido de la placa por inversión de la placa.
5. Repetir 5 veces el paso 3 y 4.
6. Golpear la placa contra un papel secante de forma que se acabe de arrastrar el contenido de la placa.
7. Añadir 200µl por pocillo de TMB (tetrametilbenzidina) y tapar la placa con papel de plata (el TMB es fotosensible).
8. Incubar la placa a temperatura ambiente durante 30 min.
9. Añadir 50µl de la solución de parada a cada pocillo (contiene ácido sulfúrico, de forma que hace virar el pH y el color de azul a amarillo).
10. Agitar la placa durante 30 seg de forma suave para homogenizar el contenido.

11. Leer la placa en un espectrofotómetro por colorimetría a una absorbancia de 450nm.
12. Ajustar la curva estándar con una regresión cúbica spline.
13. Calcular las concentraciones de las muestras.

Soluciones:

- Solución del enzima conjugado
 1. Enzima conjugado 11x 600µl
 2. Tampón del enzima conjugado 6ml
- Tampón de lavado
 1. Tampón de lavado 21x 35ml
 2. Agua destilada 700ml

9.13.- Determinación de la concentración de amilasa

Para valorar la cantidad de amilasa presente en el suero de los animales se llevaron las muestras al Centro de Diagnóstico Biomédico del Hospital Clínico y a través de un Advia Analyzer 2400 (Siemens Medical Solutions Diagnostics) se obtuvieron los valores de amilasemia.

9.14.- Determinación de la cantidad de hemoglobina glicada (HbA1c)

Para establecer el porcentaje de hemoglobina glicada (HbA1c) presente en la sangre, se utilizó el medidor DCA 2000+ (Bayer).

10.- ANÁLISIS BIOINFOMÁTICO: MICROARRAYS DE AFFYMETRIX

Con el RNA extraído de las muestras de páncreas total de los diferentes grupos experimentales (ratas sanas y diabéticas y tratadas y no tratadas con tungstato de sodio) se procedió a la hibridación de 12 microarrays (3 muestras de ratas sanas no tratadas, 3 muestras de ratas sanas tratadas, 3 muestras de ratas diabéticas no tratadas y 3 muestras de ratas diabéticas tratadas).

Se utilizaron microarrays RAE230A de la casa comercial Affymetrix. Estos microarrays se basan en sondas de 25 nucleótidos, habiendo 11 sondas por gen, con una secuencia coincidente a la región 3' del gen correspondiente (estas sondas son conocidas como PerfectMatch, PM). Además, para cada sonda hay una sonda idéntica excepto en el nucleótido 13 la cual nos permite valorar el ruido de fondo debido a uniones inespecíficas (estas sondas son conocidas como MisMatch, MM). La agrupación de las 22 sondas se conoce como Probe Set conteniendo el microarray 15923 Probe Sets.

Los microarrays contienen grupos de Probe Sets control para observar que la hibridación y la retrotranscripción han funcionado correctamente. Además, la distribución de sondas controles en los extremos del microarray producen un tablero virtual (permite a la hora de escanear el microarray localizar las sondas) y el nombre del microarray en una de las esquinas.

10.1.- *Controles de calidad*

10.1.1.- **Controles establecidos por Affymetrix**

Nuestros microarrays fueron sometidos a los controles de calidad establecidos por Affymetrix [106], a través del paquete SimpleAffy [107] del entorno Bioconductor [108] basado en el lenguaje de programación R [109, 110] y la observación de los archivos .rpt y .cel generados tras el escaneo de los microarrays por el programa de Microarray Suite 5.0 (Affymetrix).

Los controles son:

a) **Inspección visual**

Tras la hibridación y escaneo del microarray no se deben observar defectos evidentes de los mismos (rayadas, zonas de saturación, etc.).

b) Oligos B2

Los oligos B2 permiten realizar el tablero virtual del microarray para situar las sondas, además dibujan el nombre del microarray en la esquina superior izquierda y dibujan un “tablero de ajedrez” en cada esquina. Al observar el microarray una vez escaneado, éstos oligos deben de ser observados claramente.

c) Ruido de fondo medio (Average background, RawQ)

El ruido de fondo medio, calculado por el propio software de la estación de Affymetrix, permite establecer cómo de comparables son los microarrays entre si, por que el rango de valores obtenido debe ser pequeño.

d) Controles de hibridación: bioB, bioC, bioD y cre

Una vez que el cRNA de nuestra muestra se marca y se fragmenta se añaden unos cRNA marcados, cuya concentración se conoce y están en concentraciones crecientes ($\text{bioB} < \text{bioC} < \text{bioD} < \text{cre}$), con lo que la señal que se obtiene tiene que ser creciente en estas sondas y el algoritmo utilizado por el software de Affymetrix debe dar que estos controles se hayan presentes en nuestros microarrays.

e) Controles internos: GAPDH y β -actina

La mayoría de los genes tienen la Probe Set situada en la región 3' del gen a estudiar. Affymetrix ha situado en los genes *Gapdh* y *β -actina* Probe Sets en las regiones 5' y 3'. Teniendo en cuenta que la retrotranscripción es más abundante en la región 3' (debido a que se utilizan cebadores oligodT), si se calcula el ratio de la señal obtenida entre 3' y 5', éste debe ser como máximo de 3. Si la abundancia de la región 3' es superior a 3 veces la región 5' nos indicaría o que el RNA estaba inicialmente degradado o que ha habido algún problema en el proceso de retrotranscripción.

f) Porcentaje de genes presentes

A partir de las señales obtenidas por las sondas Perfect Match (valoran la unión específica) y las sondas MisMatch (valoran la unión inespecífica) se calcula mediante un algoritmo si un gen está presente o no.

Se considera que los microarrays pasan este control si este valor se mantiene homogéneo entre los diferentes microarrays (se considera informalmente que la variabilidad entre las muestras debe ser inferior al 10%).

g) Factor de normalización y escalado

Affymetrix desarrolló el algoritmo de normalización MAS5.0 (Microarray Suite 5.0). Éste se basa en multiplicar los valores de la señal de todos los genes por un factor determinado de forma que la intensidad media de un microarray sea un valor concreto. Considerando que la gran mayoría de genes no varían en diferentes condiciones, debido al hecho que la estructura y función celular se mantiene en diferentes condiciones, si escalamos todos los microarrays a un valor determinado (aplicando a cada microarray un factor de escalado diferente), podremos hacer que los diferentes microarrays sean comparables entre si.

Affymetrix considera que el valor del factor de escalado no debe ser más de tres veces superior entre el valor mínimo y el máximo de los valores obtenidos de cada microarray.

10.1.2.- Otros controles de calidad

Estos controles de calidad se obtuvieron a través del paquete Affy [111] y AffyPLM [112] del entorno Bioconductor [108] basado en el lenguaje de programación R [109, 110] y a través del programa dChip [113, 114].

a) Valores crudos de la intensidad de cada sonda

Los valores obtenidos de cada sonda de los microarrays se representan en diagramas de cajas e histogramas, debiéndose observar un comportamiento similar entre todos los microarrays.

b) “Integridad del RNA”

Teniendo en cuenta que la retrotranscripción se realiza de 3' a 5', es de esperar que dentro del grupo de sondas que representan un gen, se obtenga una señal superior en las sondas situadas en 3' respecto a las situadas en 5'. Teniendo en cuenta que una Probe Set está formada por 11 sondas, si las ordenamos de 5' a 3' y calculamos la media de la intensidad de todas las sondas situadas en cada posición (escalando los

valores), podemos obtener una recta con una pendiente positiva de unos 45°. Ésta debe ser similar para todos los microarrays.

c) Valores procesados

Cada gen viene representado por una Probe Set dentro del microarray, la cual contiene 11 sondas Perfect Match (sondas coincidentes) y 11 sondas Mis Match (sondas no coincidentes). Existen actualmente diversos algoritmos que permiten sintetizar los valores de estas 22 sondas en uno solo, de forma que a cada gen le damos un valor de expresión.

Actualmente existen dos corrientes a la hora de realizar la síntesis de todos los valores. Por un lado, una de las corrientes tiene en cuenta los valores obtenidos en las sondas Mis Match y los considera como ruido que debe ser tenido en cuenta a la hora de obtener un valor de expresión. Al frente de esta corriente existen los dos principales algoritmos diseñados por Affymetrix, MAS5.0 (MicroArray Suite 5.0) [115] y PLIER (Probe Logarithmic Intensity Error, error logarítmico de la intensidad de las sondas) [116]. Por otro lado, existe otra corriente que piensa que lo que se une a las sondas Mis Match no es del todo inespecífico, con lo que el valor obtenido en esas sondas no es exclusivamente ruido de fondo. Por ese motivo, este grupo de algoritmos no tienen en cuenta los valores obtenidos en las sondas Mis Match para obtener el valor de expresión de los genes. Al frente de esta corriente se sitúa el RMA (Robust Multi-chip Average, media robusta de múltiples microarrays) [117].

Debido al hecho que el algoritmo RMA parece ser más sensible y específico a la hora de detectar expresión diferencial de genes, se decidió sintetizar los valores de las sondas de un gen y proceder a la normalización de los microarrays con este algoritmo.

Tras aplicar este algoritmo, se representó mediante histogramas y diagramas de cajas los valores de expresión de los genes en los diferentes microarrays, debiéndose esperar un comportamiento uniforme de todas las muestras.

d) Algoritmo de detección de sondas y microarrays extraños dChip [113, 114]

A parte de los algoritmos descritos anteriormente para la síntesis de datos y la normalización de los arrays, Li y Wong [113, 114] propusieron dos nuevos algoritmos, que llevaban asociados sus controles de calidad, los cuales permitían detectar sondas o

arrays que se comportasen de forma muy diferente al resto y que debían ser eliminados de posteriores análisis. El algoritmo de detección se basa en ajustar un modelo matemático a los valores de las sondas de los diferentes microarrays, ajustando el modelo por un proceso de iteraciones hasta llegar a la convergencia del modelo establecido (se llega habitualmente entre las 5 y 10 iteraciones).

Tras aplicar este algoritmo a nuestros datos, debemos observar que el porcentaje de sondas y microarrays que tienen un comportamiento extraño está dentro de la tolerancia establecida por el algoritmo.

e) Algoritmo de detección de sondas y microarrays extraños AffyPLM [112]

Cada gen tiene 11 sondas Perfect Match y 11 sondas Mis Match, las cuales están físicamente distribuidas al azar en el microarray, de forma que las sondas que forman una Probe Set no se hayan unas junto a las otras.

1.- Pseudo-chips

Si se coge el valor de cada sonda de cada microarray y se le aplica un modelo lineal, se puede calcular los pesos y los residuales de cada sonda para cada array, los cuales se pueden representar gráficamente con la imagen de un pseudo-chip. En caso de haber algún defecto veremos en estas imágenes zonas más claras y más oscuras, que indicarían que hay una señal superior de las sondas de una zona específica del microarray, lo cual teniendo en cuenta a distribución al azar de las sondas no puede ser posible.

2.- Diagramas de cajas RLE (Relative Log Expression, expresión relativa logarítmica)

Cogiendo los valores de cada Probe Set en los diferentes microarrays, se calcula la mediana y se compara con lo valores obtenidos en cada microarray (en escala logarítmica). Teniendo en cuenta que la mayoría de los genes no varían entre los diferentes microarrays, ya que la estructura, funcionalidad y metabolismo celular se preservan, deberíamos obtener valores próximos a 0.

3- Diagramas de cajas NUSE (Normalized Unscaled Standard Errors, errores estándar normalizados sin escalar)

Cuando se ajustaron los datos al modelo lineal inicial, se estimaron unos errores estándar para cada gen. Estos valores se ajustaron para que su mediana para cada microarray fuera 1. Típicamente, unos errores estándar elevados indican una calidad inferior.

10.2.- Expresión diferencial

Los valores de intensidad de fluorescencia de cada Probe Set fueron reducidos a un único valor, el ruido de fondo de cada microarray fue corregido y se procedió a la normalización de los datos de los diferentes microarrays para que los datos obtenidos de las diferentes muestras pudieran ser comparables. Todo ello fue llevado a cabo por el algoritmo RMA (Robust Multi-chip Average) [117].

A continuación, se procedió a realizar la selección de genes diferencialmente expresados, basándonos en el siguiente modelo lineal que incluye dos variables (tratamiento y diabetes) más el efecto interacción:

$$Y_{ijk} = \mu_g + \text{Tratamiento}_{ig} + \text{Diabetes}_{jg} + (\text{Tratamiento y Diabetes})_{ijg} + \varepsilon_{ijk}$$

$i=1,2$ (tratamiento o no tratamiento)

$j=1,2$ (diabetes o no diabetes)

$k=1,2,3$ (error)

$g= 1 \dots 15923$ (gen estudiado)

La varianza estimada se moderó con una aproximación empírica Bayesiana, basada en la metodología desarrollada por Smyth [118], el cual extiende el análisis tradicional de los modelos lineales con una metodología empírica Bayesiana para combinar la información del conjunto de datos del microarray junto con cada gen individual, de forma que se obtenga una mejor estimación del error. Este método permite el cálculo del estadístico B-valor, que se define como el logaritmo de la razón de posibilidades (odd) de que un gen esté expresado vs que no esté expresado. En nuestro caso en concreto, hemos cogido como punto de corte, tras consultar con el autor del algoritmo (aunque su criterio ha cambiado en la actualidad y recomienda utilizar el p valor ajustado suministrado por la versión actual del paquete), un B-valor superior 0 para

considerar que un gen está diferencialmente expresado, que vendría a significar que es más probable que esté diferencialmente expresado vs que no.

Éste análisis se llevo a cabo través del paquete Affy [111] y LIMMA [118] del entorno Bioconductor [108] basado en el lenguaje de programación R [109, 110].

10.3.- Clasificación de los genes diferencialmente expresados

Aquellos genes que se consideraron como diferencialmente expresados fueron agrupados (clusters) según sus valores de intensidad y representados en un diagrama de calor (heatdiagram), que permite observar grupos de genes o microarrays que se comportan de manera similar. Así, sería de esperar, por ejemplo, que los animales de cada grupo se comportasen de una forma similar y se agruparan juntos, pudiéndose separar los diferentes grupos experimentales. Estos diagramas fueron realizados con el programa dChip [113, 114] y los valores que se utilizaron fueron obtenidos después de estandarizar los valores de expresión, es decir, para todos los genes de los diferentes microarrays se calculó su media y desviación estándar y al valor individual de cada gen se le restó el valor de la media de ese gen para todos los microarrays y se dividió por el de su desviación estándar.

Por último, se procedió a realizar una clasificación funcional de los genes considerados como diferencialmente expresados basándonos en las bases de datos de NetAffx [119] y GeneOntology [120].

11.- ESTADÍSTICA

Los datos en las gráficas se expresan como la media de los valores en el grupo \pm su SEM (Standard error mean, media del error estándar). Los datos se consideraron significativos cuando tras aplicar un test de t-Student o una ANOVA (analysis of variance, análisis de la varianza) con un test de post-hoc de Tukey, se obtuvo un p valor inferior a 0,05. El análisis de los datos de los microarrays se explica de forma extensiva en el capítulo anterior.

Para los estudios de correlación se calculó el coeficiente de correlación de rangos de Spearman (ρ) y su p valor asociada.

Para el cálculo de estos valores se utilizó la hoja de cálculo Excel (Microsoft), el programa SPSS (IBM) y el lenguaje estadístico R.

En el caso de los datos longitudinales (test de tolerancia intraperitoneal a la glucosa, test de resistencia intraperitoneal a la insulina y evolución del peso de los animales sanos tratados y no tratados con tungstato de sodio y los animales sometidos a restricción calórica), éstos fueron analizados por la Dra Ruiz de Villa del departamento de estadística de la facultad de Biología, a través de modelos mixtos jerárquicos y utilizando el paquete nlme en el lenguaje R.



Taillon

3144 m

RESULTADOS

1.- MECANISMOS DE REGENERACIÓN PANCREÁTICA POR LOS CUALES ACTÚA EL TUNGSTATO DE SODIO EN LAS RATAS DIABÉTICAS

1.1.- Caracterización fenotípica

Se adquirieron ratas macho de la cepa Wistar (Charles River) de unos 225-250 g y se las estabuló durante una semana para reducir el estrés sufrido por el transporte. Transcurrida esta semana se separaron las ratas en dos grupos. A uno de ellos se les indujo diabetes a través de una inyección intraperitoneal del tóxico beta específico estreptozotocina (ratas diabéticas) y al otro grupo tan solo se le administró el tampón citrato de disolución (ratas sanas). Una semana después de la inyección, se comprobó su glucemia, considerándose como aptas para el estudio aquellas ratas que pertenecían al grupo de animales diabéticos que presentaban glucemias superiores a 400mg/dl. En ese momento se separaron los animales en dos subgrupos más, animales tratados con tungstato de sodio y animales sin tratar, tratamiento que duró unas 4 semanas. De esta forma el proyecto consta de cuatro grupos experimentales: ratas sanas sin tratar (SNT), ratas sanas tratadas (ST), ratas diabéticas no tratadas (DNT) y ratas diabéticas tratadas (DT).

Durante las 4 semanas de tratamiento, se realizó un seguimiento de la glucemia de los animales cada 5 días aproximadamente, obteniendo el perfil glicémico presentado en la figura 19 (perfil similar al ya anteriormente descrito [69]). En él se observa una recuperación parcial de la glucemia de los animales diabéticos tratados con tungstato de sodio, sin modificarse la glucemia de los animales sanos.

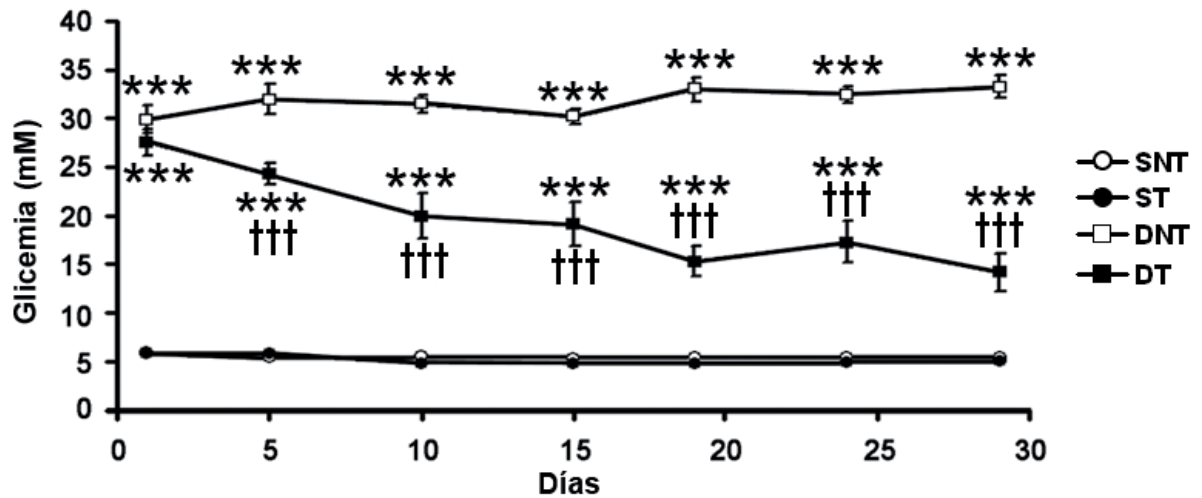


Fig. 19. Seguimiento de la glucemia en los grupos experimentales examinados. $n=9$, *** $p<0,001$ vs. SNT, +++ $p<0,001$ vs. DNT.

Además, se determinó la insulinemia y la amilasemia en estos animales al final del tratamiento, observándose que ambos parámetros estaban muy disminuidos en los animales diabéticos sin tratar y parcialmente recuperados en los animales diabéticos tratados (Fig. 20). En el caso de los animales sanos, la insulinemia de los animales tratados se observó disminuida, mientras que su amilasemia no presentaba cambios significativos.

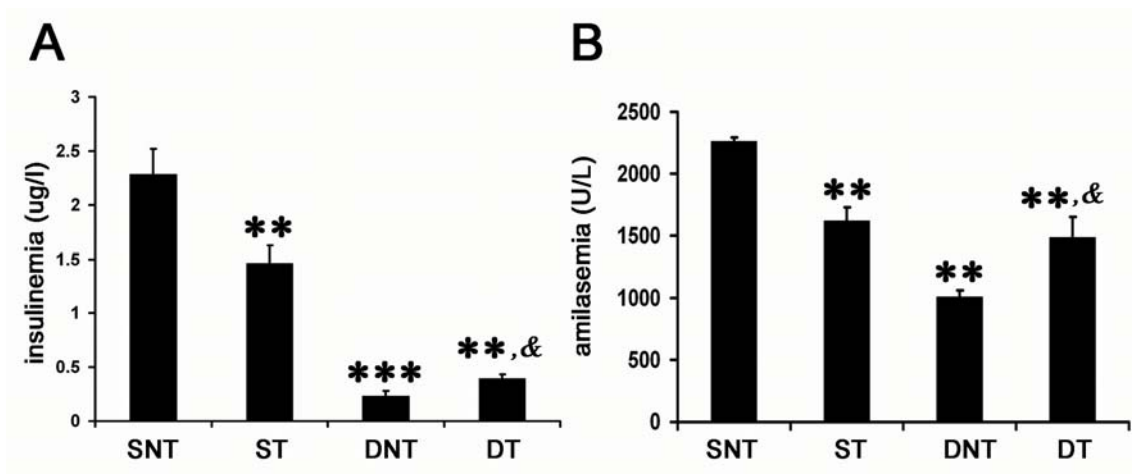


Fig. 20. Valores de insulinemia (A) y de amilasemia (B) en ratas sanas y diabéticas tratadas y no tratadas con tungstato de sodio al final del tratamiento. $n=8-10$. *** $p<0,001$ y ** $p<0,01$ vs. SNT y & $p<0,05$ vs. DNT.

1.2.- Caracterización morfológica del páncreas de las ratas de los diferentes grupos experimentales

Tras los primeros resultados obtenidos en las ratas tratadas con tungstato de sodio, se procedió a caracterizar morfológicamente el páncreas de estos animales. Estudio que fue realizado por el Dr. del Zotto y el Prof. Gagliardino de la Universidad de la Plata (Argentina). Sus resultados muestran que el porcentaje de células beta en el páncreas total de los animales diabéticos tratados con tungstato se cuadruplica de manera significativa respecto a los animales diabéticos no tratados, mientras que no hay un cambio significativo en los animales sanos tratados (SNT: $1,77 \pm 0,27$, ST: $1,82 \pm 0,26$, DNT: $0,05 \pm 0,01$ [$p < 0,01$ vs. SNT], DT: $0,20 \pm 0,05$ [$p < 0,01$ vs. SNT y $p < 0,05$ vs. DNT], $n=6$). Además, se observó que el tratamiento con tungstato de sodio inducía una mejora en la morfología de los islotes de los animales diabéticos, ya que éstos presentaban un incremento del número de células que presentaban una tinción positiva para insulina y Pdx-1 (Fig. 21 A-C). En el caso de los animales sanos, el tratamiento no produjo ninguna modificación a este nivel.

Por último, al realizar estudios de apoptosis y proliferación (Fig. 21 D y E), se observó que el tratamiento en los animales diabéticos daba lugar a una normalización de la tasa de apoptosis (incrementada con la diabetes) y a un aumento de la proliferación celular. En los islotes de los animales sanos, el tratamiento no produjo ninguna modificación en la apoptosis, mientras que produjo un incremento en la proliferación.

1.3.- Caracterización de la expresión génica por microarrays

Una vez observados los efectos del tratamiento sobre el fenotipo de los animales y la morfometría del páncreas se quisieron determinar los cambios en la expresión génica. Para ello se decidió hibridar microarrays de la casa comercial Affymetrix del tipo RAE230A con el RNA proveniente del páncreas total de las ratas de cada grupo experimental.

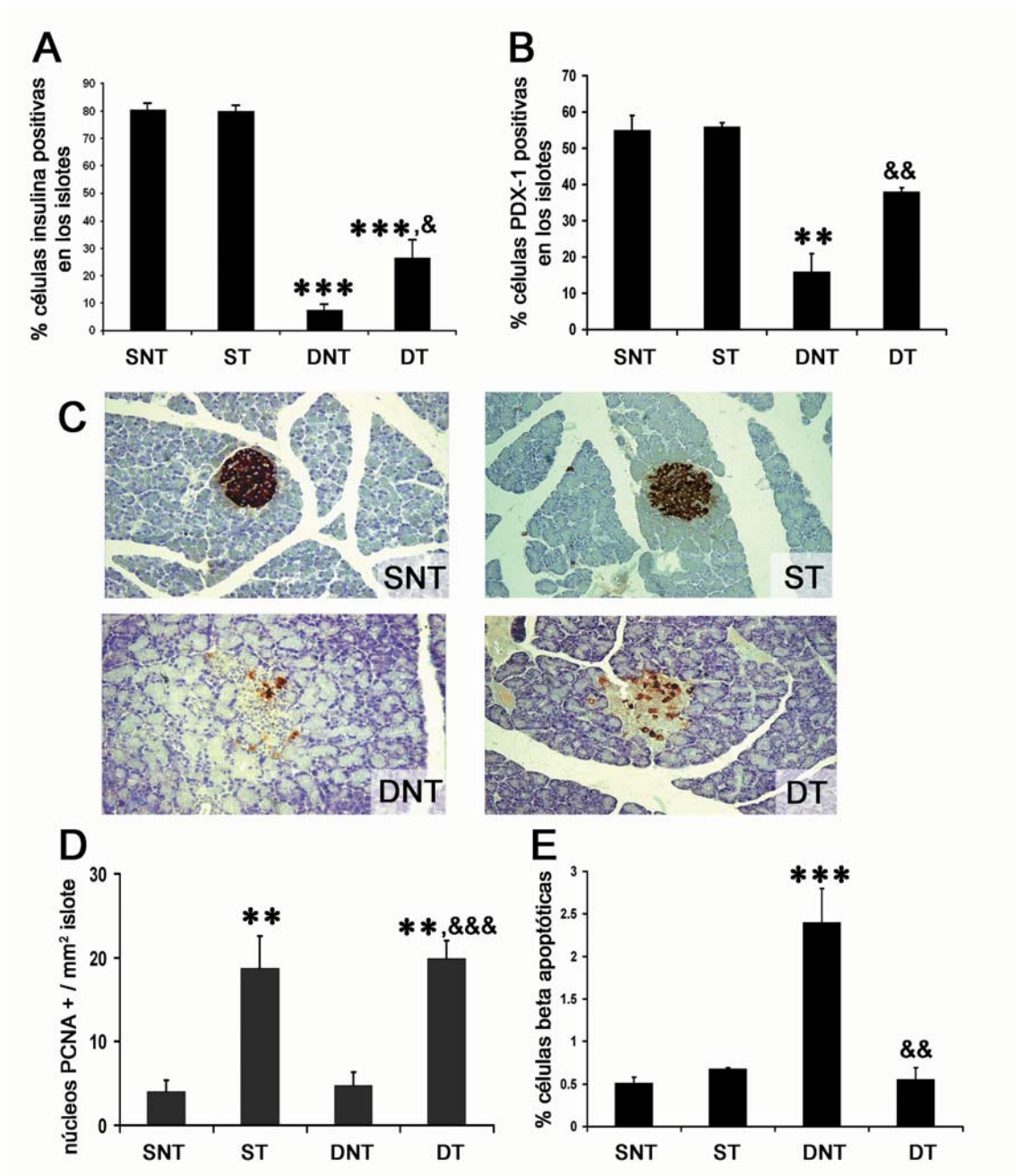


Fig. 21. Características morfométricas de los páncreas de las ratas sanas y diabéticas tratadas y no tratadas con tungstato de sodio. **A** y **B**. Porcentaje de células positivas para insulina (**A**) y Pdx-1 (**B**) en los islotes de los páncreas analizados a tres niveles diferentes, $n=6$. **C**. Imágenes representativas de secciones pancreáticas teñidas con insulina (magnificación 20x). **D** y **E**. Apoptosis (**D**) y proliferación (**E**) examinadas por tinciones con yoduro de propidio y PcnA respectivamente, $n=8-10$. *** $p<0,001$ y ** $p<0,01$ vs. SNT y &&& $p<0,001$, && $p<0,01$ y & $p<0,05$ vs. DNT.

1.3.1.- Puesta a punto de la extracción de RNA

Para proceder a la hibridación de los microarrays, obtuvimos RNA de páncreas total a través de una modificación del protocolo de Chomczynski y Sacchi [121], que nos permitió obtener un RNA de una integridad apropiada. Este protocolo impide trabajar con más de 4 muestras, ya que los tiempos de espera entre cada paso se alargan, hecho que hace que la integridad del RNA peligre. Por ello se debía decidir entre sacrificar todos los animales simultáneamente y conservar las muestras de alguna manera sin que su RNA se degradase, o bien sacrificar los animales de forma escalonada (4-6 diarios) y proceder a la extracción de su RNA.

Por este motivo se realizó una batería de pruebas, cuyos resultados se ven en la figura 22, en la que se procesó el páncreas después de haberlo extraído (Fig. 22.A), tras haberlo congelado en nitrógeno líquido y tenerlo una semana guardado a -80°C (Fig. 22.B), después de tratarlo con RNAlater (Ambion) durante una semana a 4°C (Fig. 22.C) o tras tratarlo con RNAlater durante 24 horas a 4°C y guardarlo sin RNAlater una semana a -80°C (Fig. 22.D). Con este experimento se concluyó que este protocolo de obtención de RNA daba un resultado satisfactorio en muestras recién extraídas, que la congelación en nitrógeno líquido sin tratar la muestra no evitaba la degradación del RNA y que el RNAlater evitaba parcialmente (en el caso de la conservación durante una semana a 4°C) o totalmente (en el caso de la conservación a 4°C durante 12 horas y a -80°C sin RNAlater durante una semana). Así, las muestras procesadas con este protocolo en el momento de la extracción o tras haberlas sumergido en RNAlater durante 12 horas a 4°C y luego conservadas a -80°C dan un RNA de calidad óptima para ser utilizado para la hibridación de microarrays. Entre estas dos opciones nos acabamos decantando por la opción de trabajar con páncreas recién extraídos (para evitar introducir más variables al experimento) y escalar el sacrificio de los animales a 4 animales por día.

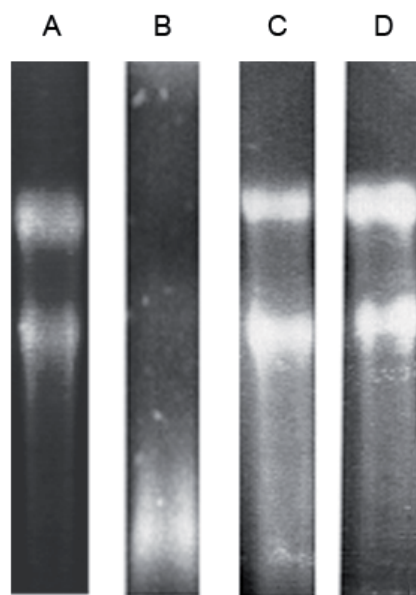


Fig. 22. Muestras de RNA de páncreas total electroeluidas en un gel de agarosa desnaturizante. **A.** RNA de un páncreas procesado sin demora. **B.** RNA de un páncreas congelado en nitrógeno líquido y conservado una semana a -80°C . **C.** RNA de un páncreas conservado en RNAlater a 4°C durante una semana. **D.** RNA de un páncreas conservado en RNAlater a 4°C durante 12 horas y a -80°C sin RNAlater durante una semana.

1.3.2.- Extracción de RNA

El RNA se extrajo del páncreas de entre 12 y 15 animales por grupo experimental y se procesó por separado, observándose su perfil de tamaño y cantidad a través de un gel desnaturizante de agarosa y prestando especial atención a las bandas de RNA ribosómico 18S y 28S. Si éstas se veían con claridad, se procedía a determinar el perfil a través del 2100 BioAnalyzer (Agilent).

A través de los perfiles de RNA (electroferogramas) observados por el 2100 BioAnalyzer (Fig. 23) se descartaron aquellas muestras que presentaban un RNA degradado en el que los picos de 18S y 28S no se observaban o no se distinguían de los picos de degradación. Todas las muestras presentaron un cierto grado de degradación (el electroferograma debería verse casi plano con tan solo dos picos y en nuestro caso se ven varios picos además de los RNA ribosómicos y una cierta cantidad de RNA pequeño, producto de degradación, a la izquierda del electroferograma), pero éste era

constante entre todas las muestras y se distinguían los picos del RNA ribosómico, con lo que se consideró que las muestras tenían la suficiente calidad como para ser hibridadas. A continuación se agruparon las muestras de tres en tres, de forma que se hicieron grupos (*pools*) (el perfil de los RNAs seleccionados para formar cada grupo se muestra en la Fig. 23.).

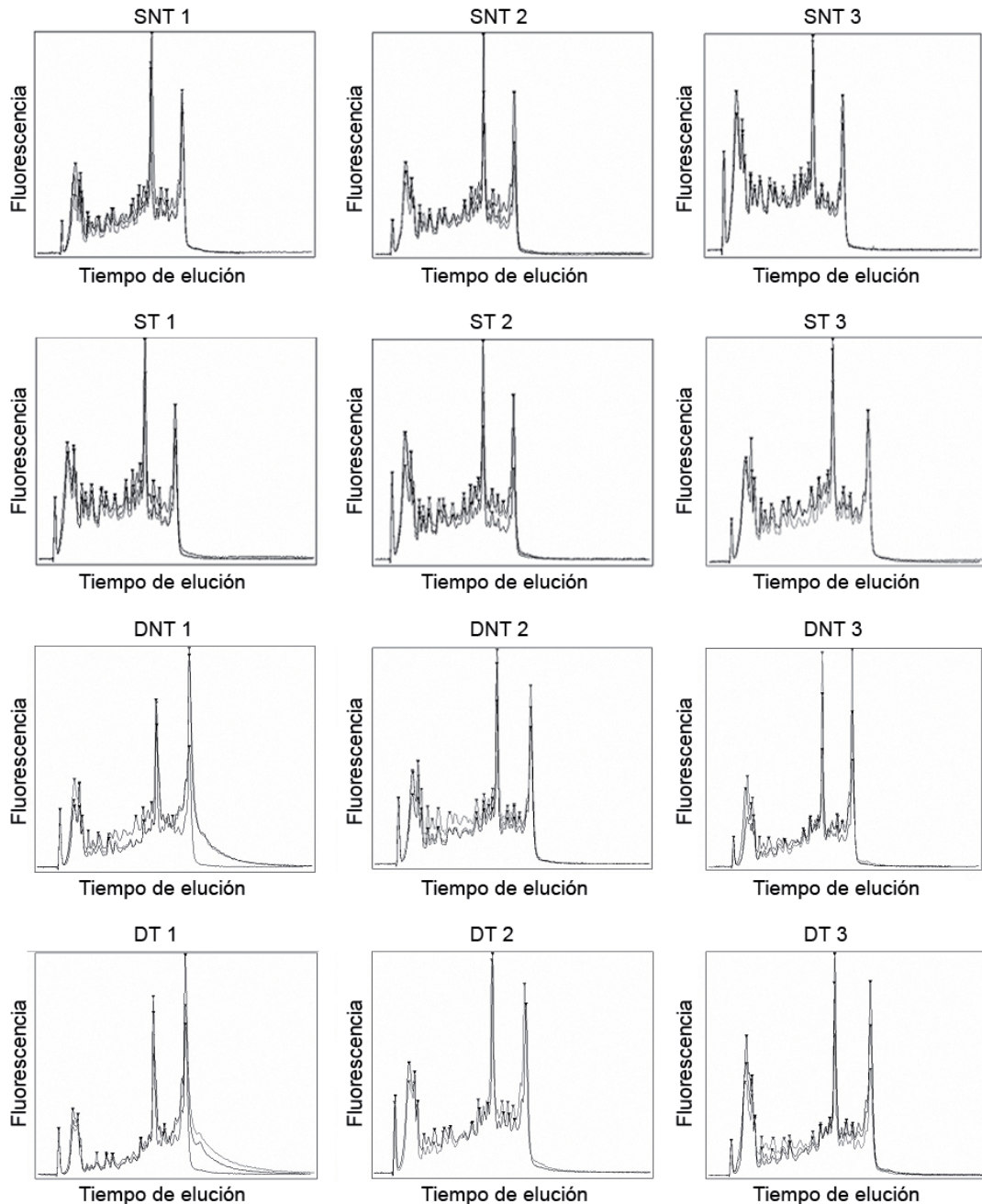


Fig. 23. Perfil de RNA (electroferogramas) de las muestras seleccionadas para hibridar los arrays de cada grupo obtenidos por el 2100 Bioanalyzer. En el eje de las Y se expresa la fluorescencia detectada y en el eje de las X el tiempo que ha tardado en salir la muestra.

De esta forma, disponemos de 36 ratas, divididas en 18 ratas sanas y 18 ratas diabéticas y que a su vez se subdividen en 9 ratas no tratadas con tungstato de sodio y 9 ratas tratadas. Por último, de cada subgrupo de 9 ratas, se juntó el material de 3 ratas formando 3 *pools* y con lo que se hibridaron tres microarrays por grupo experimental, obteniendo un total de 12 microarrays (Fig. 24).

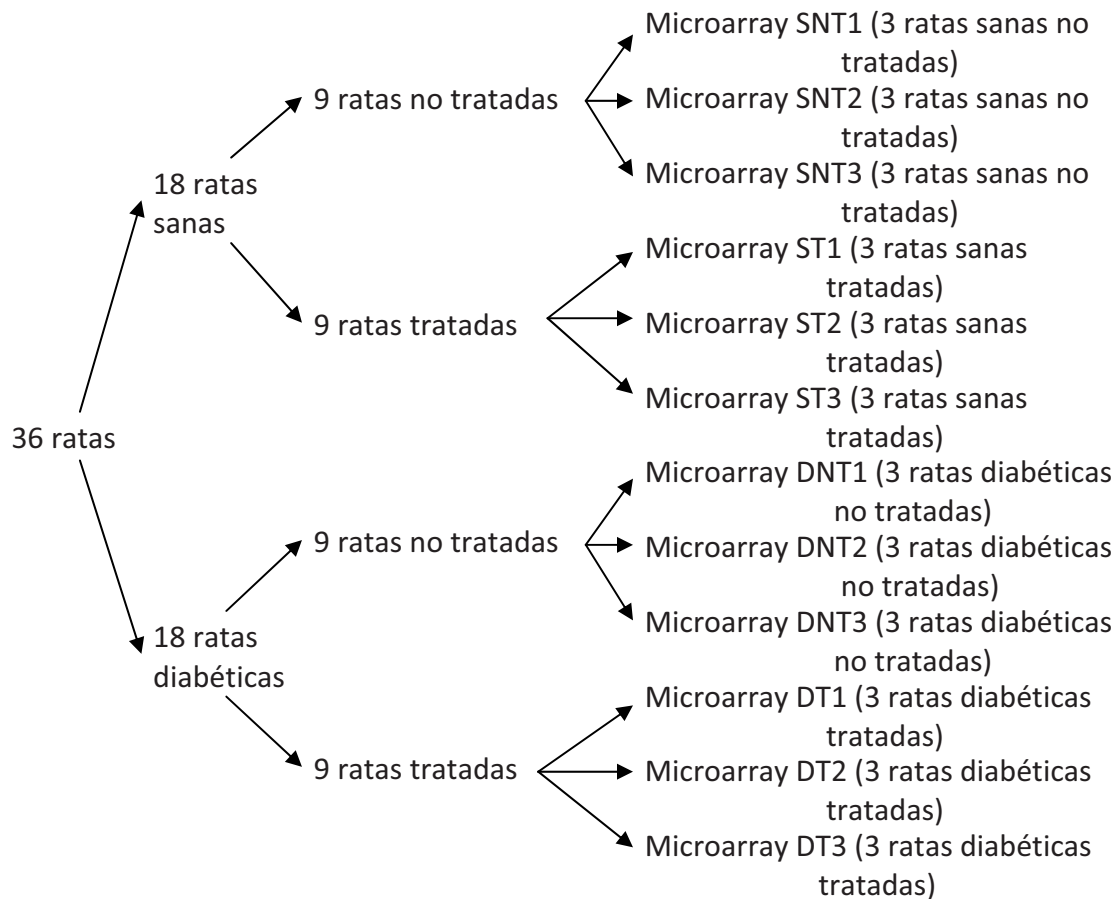


Fig. 24. Esquema experimental del experimento realizado con microarrays para la observación de la expresión génica de cada grupo experimental.

1.3.3.- Hibridación de los microarrays

Con el RNA obtenido de los diferentes grupos experimentales se procedió a realizar la hibridación de los 12 microarrays de Affymetrix RAE230A. Este proceso fue realizado en la Unidad de Genómica del Hospital Clínico.

1.3.4.- Controles de calidad de los microarrays

Antes de proceder al análisis de los datos obtenidos por los microarrays, se debe estar seguro que éstos son capaces de superar una serie de controles de calidad, de forma que aseguremos la fiabilidad de los datos y que las diferencias que podamos observar sean debidas únicamente a las muestras y no a problemas durante la retrotranscripción, hibridación o escaneo de las muestras.

1.3.4.1.- Controles de Affymetrix^[106]

a.- Inspección visual

Con una observación general de los microarrays no se observó ningún defecto evidente de los mismos (rayadas, zonas de saturación, etc.). Ejemplo representativo en la Fig. 25.

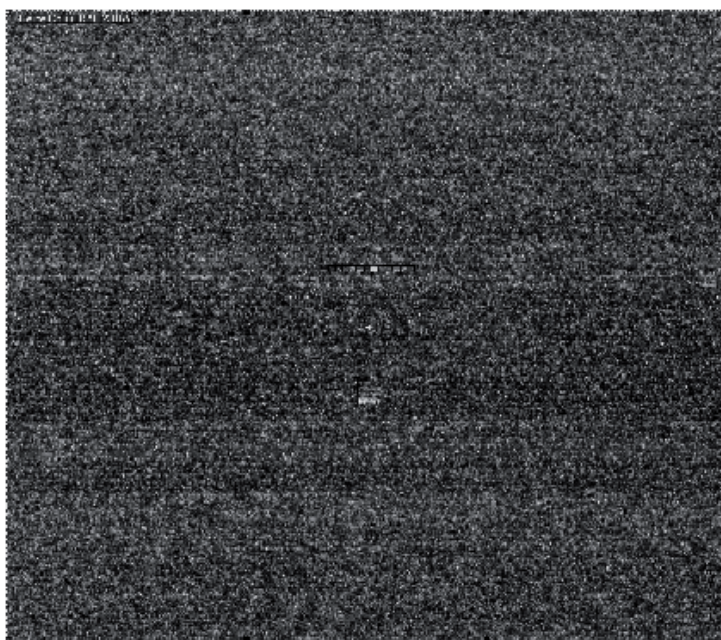


Fig. 25. Visualización del microarray DT1 tras ser escaneado. No se observan defectos evidentes.

b.- Oligos B2

La inspección visual del microarray permitió observar con claridad los patrones de los bordes, las esquinas y el nombre de los arrays. Ejemplo representativo en la Fig. 26.



Fig. 26. Detalle del microarray DT1. Se puede leer el nombre del microarray, ver la cuadrícula situada en la esquina y ver la línea punteada de los extremos.

c.- Ruido de fondo medio (Average background, RawQ)

El ruido de fondo medio, calculado por el propio software de la estación de Affymetrix, fue homogéneo entre las muestras, teniendo una media de 2,54 y un rango de entre 2,13 y 3,15.

d.- Controles de hibridación: bioB, bioC, bioD y cre

En los microarrays realizados, los controles de hibridación dieron señal creciente de bioB, bioC, bioD y cre y todos ellos fueron encontrados presentes en el microarray, con lo que se consideró que el proceso de hibridación funcionó correctamente.

e.- Controles internos: *Gapdh* y β -actina

El ratio de 3' a 5' del conjunto de sondas (*probesets*) para *Gapdh* y β -actina fue siempre inferior a 3. En concreto para *Gapdh* se obtuvo una mediana del ratio 3'/5' de 1,435, con un rango de 1,04 a 1,62 y para β -actina se obtuvo una mediana del ratio 3'/5' de 1,315, con un rango de 0,94 a 1,93. Por ello concluimos que el proceso de retrotranscripción funcionó correctamente.

f.- Porcentaje de genes presentes

En nuestros microarrays el porcentaje de genes considerados presentes permaneció constante entre los diferentes microarrays, teniendo una mediana del 31.9%, con un rango del 29,2 al 34,9%.

g.- Factor de normalización y escalado

Aplicando un escalado global con una intensidad objetivo de 150, el factor de escalado fue similar entre todos los microarrays, teniendo una mediana de 2,090 y un rango de 1,257 a 2,705.

Por todo ello concluimos que nuestros microarrays satisficieron los controles de calidad establecidos por Affymetrix.

1.3.4.2.- Otros controles de calidad

a.- Valores crudos de los arrays

Los valores obtenidos de cada sonda de los microarrays fueron representados en diagramas de cajas e histogramas, observando un comportamiento muy similar entre los diferentes arrays (Fig. 27 A y B), con lo que consideramos que nuestras muestras pasaron este control de calidad.

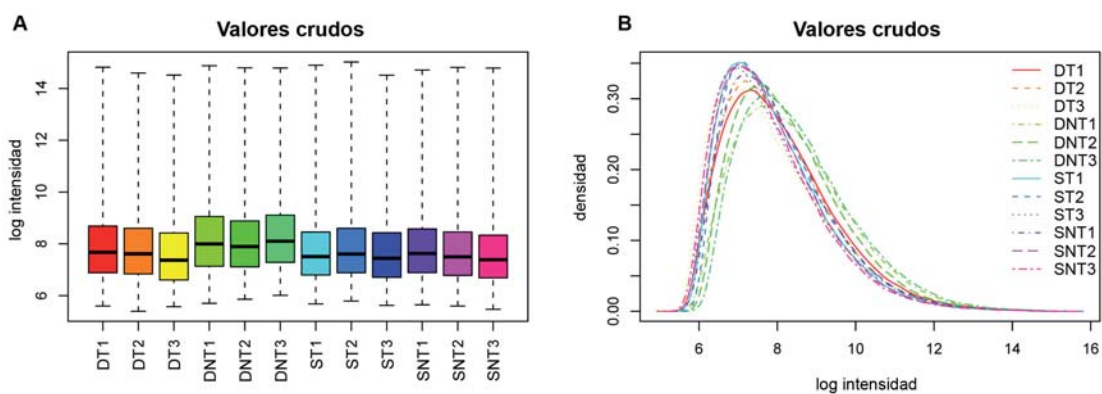


Fig. 27. Representación gráfica de todos los valores de todas las sondas del microarray para cada microarray. Representación en forma de diagrama de cajas (A) o histogramas (B).

b.- Cálculo indirecto de la integridad del RNA

Teniendo en cuenta que cada conjunto de sondas para cada gen (*probeset*) está formada por 11 sondas, si las ordenamos de 5' a 3' y calculamos la media de la intensidad de todas las sondas situadas en cada posición (escalando los valores) podemos obtener una recta con una pendiente positiva de unos 45°. En nuestro caso (Fig. 28) estas pendientes son similares entre los diferentes microarrays, de forma que consideramos que las muestras pasaron este control de calidad.

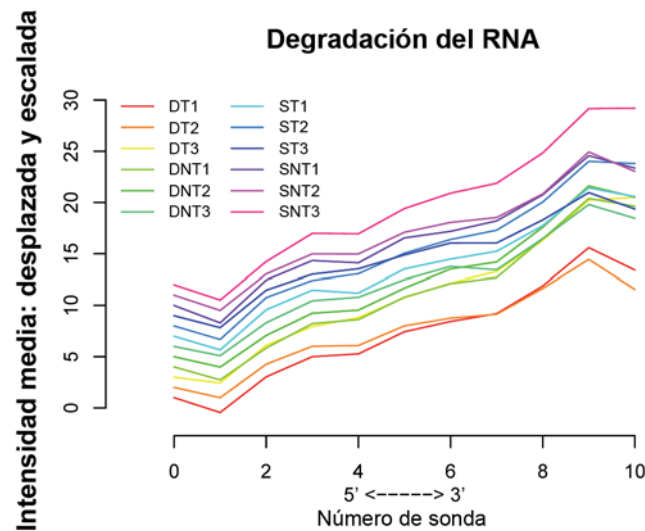


Fig. 28. Valores medios de todas las sondas situadas en la misma posición dentro de la probeset. Las diferentes curvas fueron desplazadas y escaladas para que se mostrasen apiladas una encima de las otras y permitir su comparación.

c.- Valores procesados

Tras aplicar el algoritmo RMA [117] a los valores crudos, éstos fueron normalizados, se corrigió el ruido de fondo y se sintetizaron los valores de forma que para cada conjunto de sondas (*probeset*) hubiera un único valor de expresión. Al representar estos valores en diagramas de cajas e histogramas (Fig. 29), se observó que las diferentes muestras presentaban un comportamiento uniforme, de forma que superaban este control de calidad.

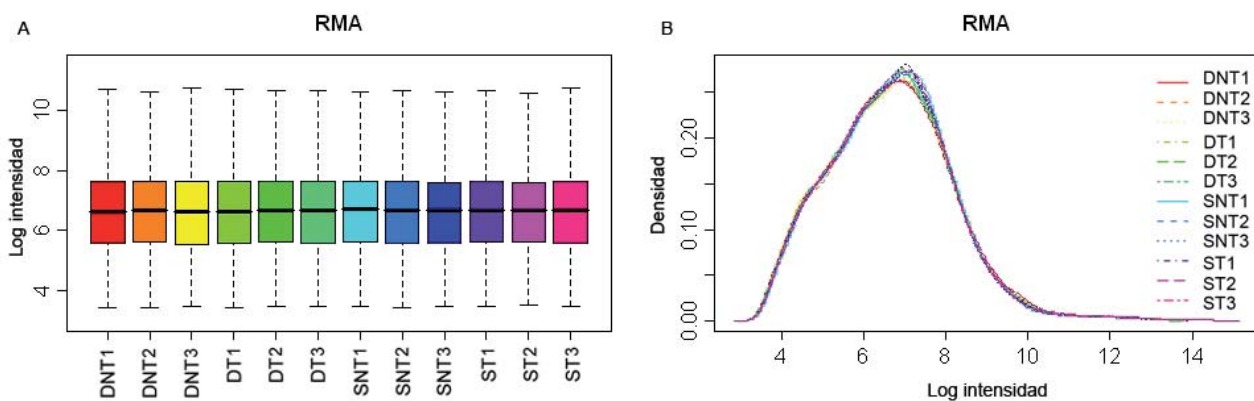


Fig. 29. Representación gráfica de los valores de todas las probesets tras aplicar el algoritmo RMA. Representación en forma de diagrama de cajas (A) o histogramas (B).

d.- Algoritmo de detección de sondas y microarrays extraños dChip [113]

Tras aplicar este algoritmo a nuestros datos, observamos que el porcentaje de sondas y microarrays que tenían un comportamiento extraño estaba dentro de la tolerancia establecida por el algoritmo, lo cual nos permite afirmar que nuestros datos eran de buena calidad.

e.- Algoritmo de detección de sondas y microarrays extraños AffyPLM [112]

1.- Pseudo-chips

Realizando los pseudo-chips de nuestras muestras se obtuvieron las imágenes mostradas en la Fig. 30. Se observa que las muestras presentan pequeños defectos (zonas más oscuras), pero consultándolo con el autor del algoritmo (Dr Ben Bolstad, Universidad de California, Berkeley, Estados Unidos), éste considera que son normales en esta versión de los microarrays y que estas zonas defectuosas se ven contrarrestadas por el hecho que las diferentes sondas de cada *probeset* se distribuyan por todo el microarray de forma aleatoria.

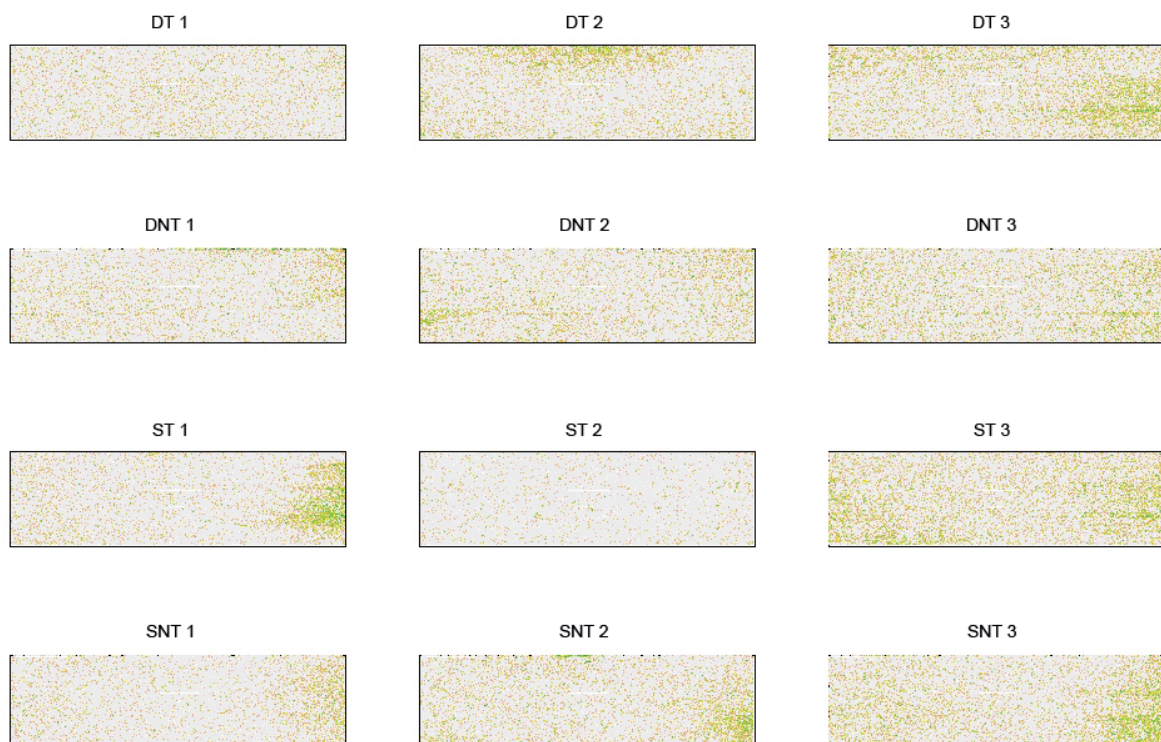


Fig. 30. Representación gráfica de los pseudo-chips obtenidos para cada microarray.

2.- Diagramas de cajas RLE (Relative Log Expression)

Se representó la diferencia entre la mediana y el valor de cada *probeset* en los diferentes microarrays, en escala logarítmica y a través de diagramas de cajas (Fig. 31). Teniendo en cuenta que la mayoría de los genes no varían entre los diferentes microarrays, se obtuvo un valor próximo a cero y se observó un comportamiento homogéneo entre las diferentes muestras.

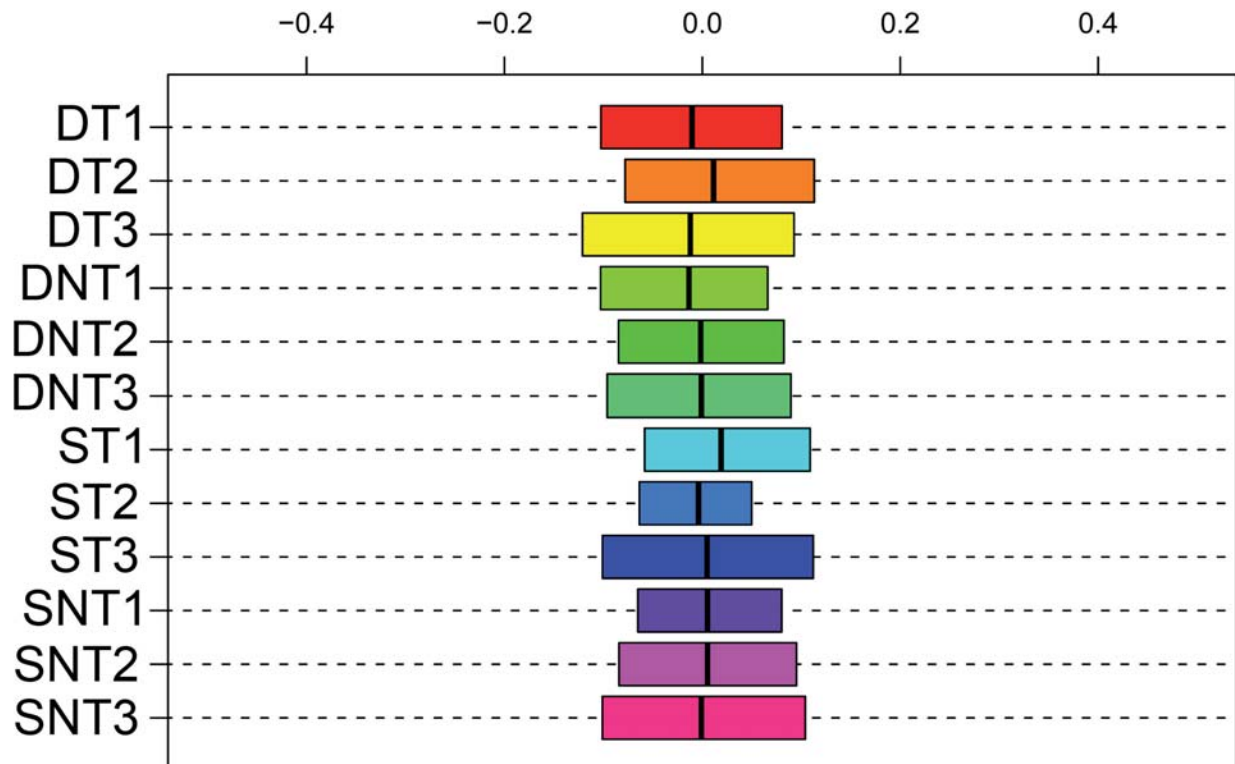


Fig. 31. Diagramas de cajas RLE para cada microarray.

3.- Diagramas de cajas NUSE (Normalized Unscaled Standard Errors, errores estándar normalizados sin escalar)

Se representaron a través de diagramas de cajas los errores estándar para cada gen en cada microarray tras aplicar un modelo lineal, observándose una cierta heterogeneidad en las muestras (Fig. 32). Curiosamente, se observó un patrón, en el que los arrays con el número 3 presentan valores de error estándar superiores a los arrays con el número 1. Este fenómeno refleja un cierto ruido de fondo introducido durante el proceso de hibridación, debido al hecho que los microarrays no se

hibridaron todos juntos, si no que se fueron hibridando conforme se iba obteniendo la muestra, así, por ejemplo, la muestra SNT1 se hibridó antes que la muestra SNT3. De todas formas, las diferencias no eran tan grandes como para considerar que existiesen elementos extraños (*outliers*) dentro de nuestras muestras.

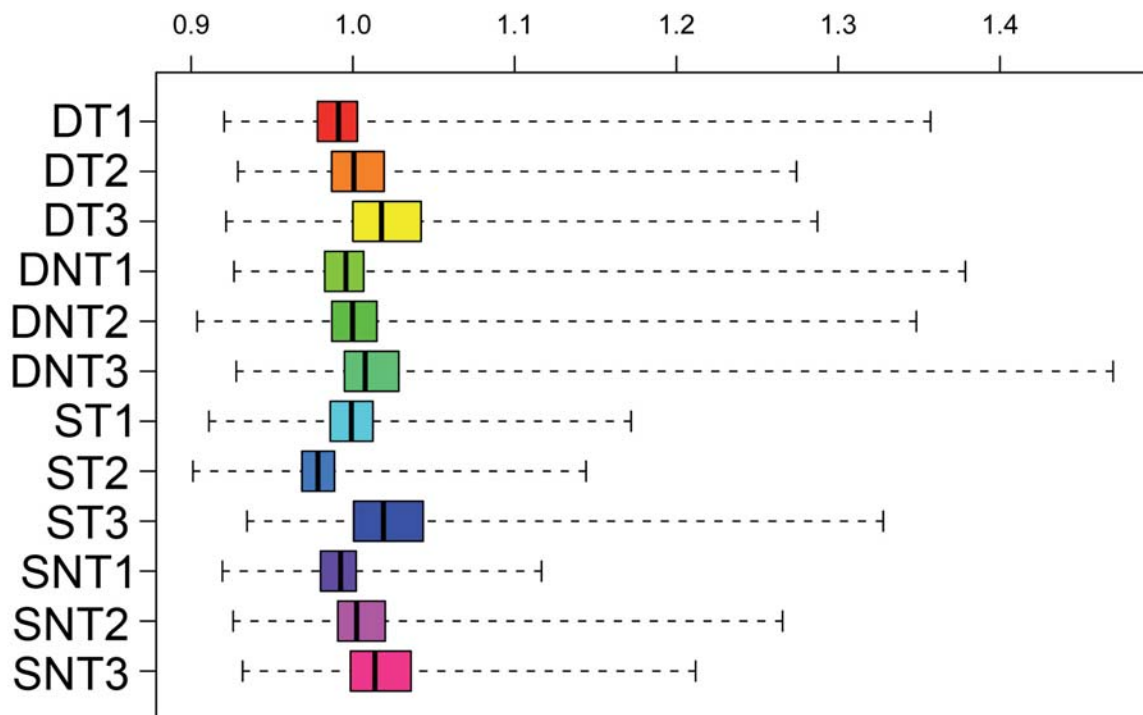


Fig. 32. Diagramas de cajas NUSE para cada microarray.

1.3.4.3.- Conclusión de los controles de calidad

Concluimos que nuestros microarrays pasaron todos y cada uno de los controles de calidad a los cuales se les sometió, con lo que se procedió a su análisis.

1.3.5.- Análisis de los microarrays

Tal como se expone en el apartado de métodos, los datos crudos fueron procesados con el algoritmo RMA [117] para sintetizar los resultados. A continuación, utilizando una aproximación Bayesiana implementada en el paquete LIMMA [118] del entorno Bioconductor [108], se obtuvieron aquellos genes diferencialmente expresados en

cada grupo a través de una aproximación a un modelo lineal en el que se incluían las variables de interés.

Así, se obtuvieron 3 listas de genes diferencialmente expresados para las variables diabetes, tratamiento y diabetes con tratamiento (ver Additional file 1 y 2 del artículo “Molecular mechanisms of tungstate-induced pancreatic plasticity: a transcriptomics approach”, págs. 264-279). En el caso de la variable tratamiento (sin diabetes), no se observó ningún gen diferencialmente expresado. En el caso de la variable diabetes, se observaron 282 genes expresados diferencialmente en los animales diabéticos sin tratar y en el caso de la variable diabetes con tratamiento se detectaron 88 genes en los animales diabéticos tratados. De estos 88 genes, un 68% (60) eran genes que también se encontraban en la lista de genes modificados por la diabetes, lo cual significa que en muchos de los casos el tratamiento en los animales diabéticos provocaba una recuperación total o parcial de la expresión de aquellos genes alterados.

Con todos los genes diferencialmente expresados se construyó a través del programa dChip un diagrama de calor (*heatdiagram*) (Fig. 33), en la que se clasifican los genes (parte vertical del *heatdiagram*) y las muestras (parte horizontal del *heatdiagram*) a través de un algoritmo que mide cómo de similar son los genes y las muestras entre sí, situándolos cerca cuanto más similares son y lejos cuanto más diferentes.

A través del *heatdiagram* (lado derecho), podemos observar que la agrupación de las muestras imita el fenotipo observado, de forma que se separan perfectamente las muestras sanas de las muestras diabéticas y dentro de las diabéticas aquellas que han recibido el tratamiento de aquellas que no lo han recibido. Además, con el *heatdiagram* (parte superior y rectángulos), podemos distinguir dentro de los genes diferencialmente expresados tres subgrupos de genes a través de los perfiles de expresión: aquellos genes que son modificados por la diabetes, aquellos genes modificados por la diabetes y que el tratamiento restablece total o parcialmente su expresión y aquellos genes que solo son modificados por el tratamiento en los animales diabéticos, pero que la diabetes no modifica.

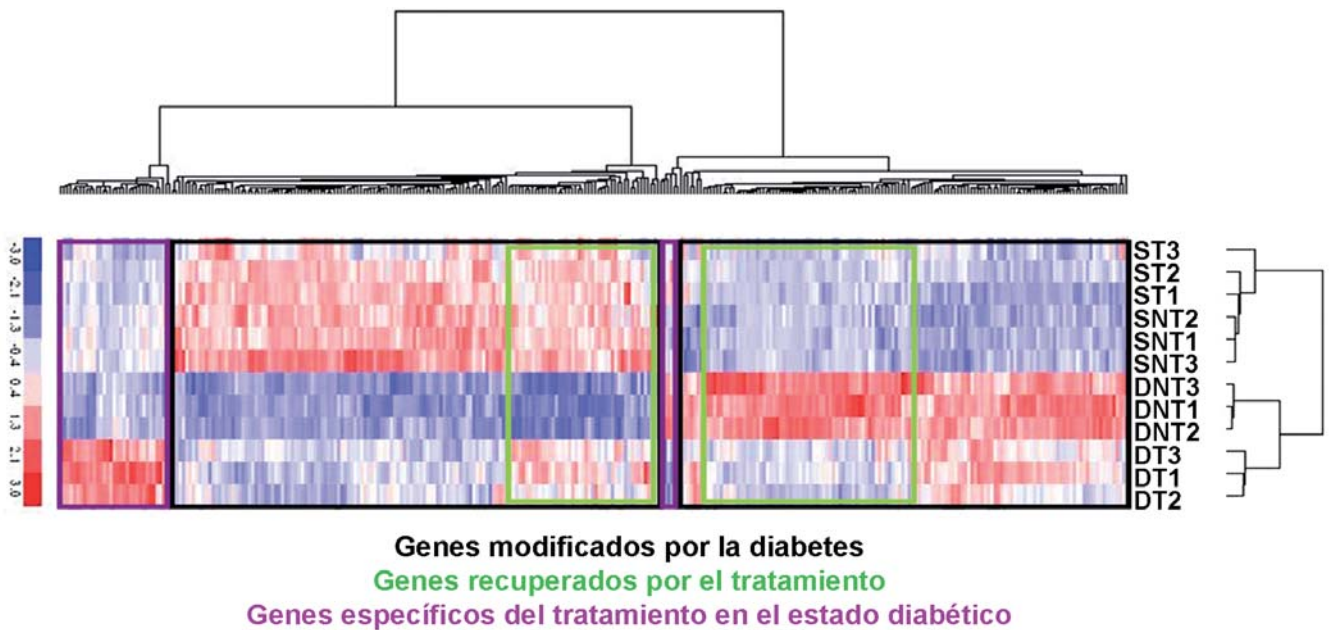


Fig. 33. *Heatdiagram* de los genes diferencialmente expresados en los diferentes microarrays. En vertical se hayan los genes y en horizontal los microarrays. En los extremos superior y derecho hay un árbol de correlaciones, en la que se agrupan genes o microarrays similares. Cada cuadrado con una gradación de rojo a azul indica un gen y el color indica cómo de alejado está respecto a la media de ese gen en todos los microarrays (aumentado en rojo y disminuido en azul). Con un recuadro negro se han resaltado aquellos genes modificados en la diabetes, con un recuadro verde se han resaltado dentro de los genes modificados por la diabetes, aquellos cuya expresión se ve recuperada por el tratamiento y con un recuadro lila se marcan aquellos genes que se expresan de forma diferente únicamente en el caso de los animales diabéticos y tratados con tungstato de sodio.

Por otro lado, los genes diferencialmente expresados en el grupo de animales diabéticos sin tratar y de los animales diabéticos tratados se clasificaron utilizando la base de datos de Gene Ontology [120] y NetAffx [119] (ver Additional file 1 y 2 del artículo “Molecular mechanisms of tungstate-induced pancreatic plasticity: a transcriptomics approach”, págs. 264-279) y realizando diagramas circulares (Fig. 34-35). Cabe comentar que entre los genes diferencialmente modificados, existen genes implicados en el metabolismo, ciclo celular, estructurales, etc. Lo cual indica que la diabetes altera muchas vías diferentes y que el tratamiento actúa también sobre varias vías.

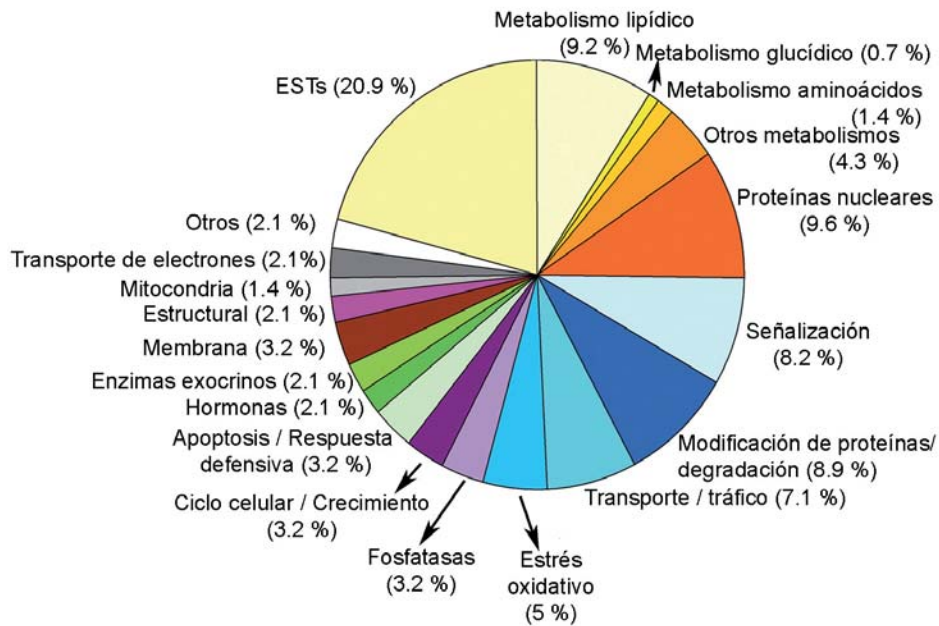


Fig. 34. Diagrama circular con los genes expresados diferencialmente en el grupo de diabetes, expresando la función en la que están implicados y el porcentaje de genes que ocupan cada categoría.

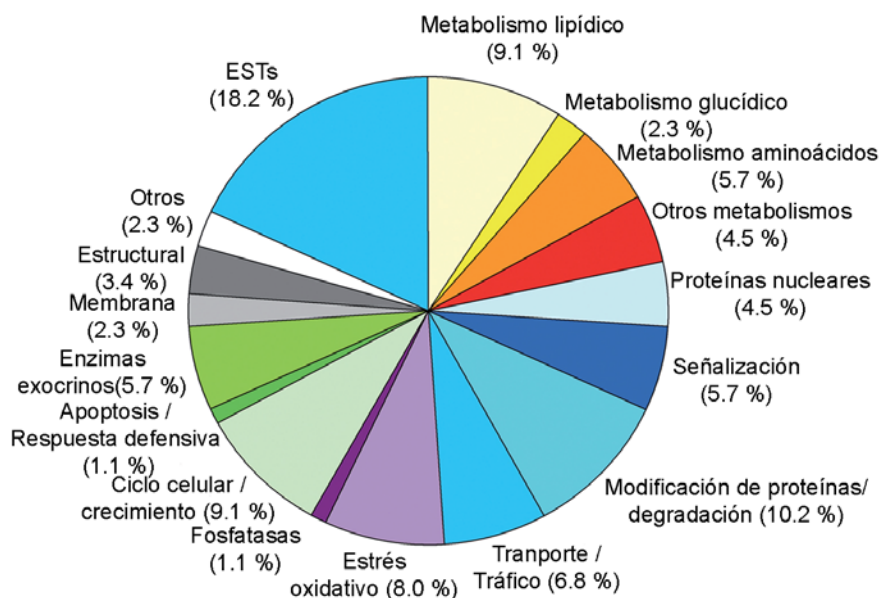


Fig. 35. Diagrama circular con los genes expresados diferencialmente en el grupo de los animales diabéticos tratados con tungstato, expresando la función en la que están implicados y el porcentaje de genes que ocupan cada categoría.

1.3.6.- Selección de los genes a analizar

Debido a que se estaba trabajando con una lista de más de 300 genes, se decidió reducir esta lista a una serie de genes que según la bibliografía pudieran explicar la regeneración del páncreas observada en los animales diabéticos tratados con tungstato de sodio. Por ello se procedió a realizar una búsqueda exhaustiva sobre las funciones de estos genes, obteniendo un total de 7 genes:

Gen seleccionado	¿Por qué?	Vías implicadas	Referencias
Rkip (Raf kinase inhibitor protein, proteína inhibidora de la quinasa Raf)	<ul style="list-style-type: none"> En el páncreas, se localiza específicamente en los islotes Controla la proliferación de las células beta Se une a Raf-1 bloqueando la activación de Mek y Erk El tungstato activa la vía clásica de MAPK (Ras->Raf->Mek->Erk) en hepatocitos 	MAPK p42/44	[3, 122]
Fgf13 (Fibroblast growth factor 13, factor de crecimiento de fibroblastos 13)	<ul style="list-style-type: none"> Fgf13 se une a islet-brain 2, reclutando a p38 e incrementando la actividad de esta quinasa El tungstato incrementa la fosforilación de p38 en los islotes de las ratas nSTZ 	MAPK p38	[2, 123]
Tspn8 (Tetraspanin 8)	<ul style="list-style-type: none"> Tetraspanin 8 podría ejercer una actividad protumoral a través de un incremento de la motilidad celular y de la inducción de angiogénesis La estreptozotocina provoca una reducción del área capilar en los islotes y una afectación severa del riego microcirculatorio en el interior de los islotes 		[124, 125]
Usag-1 (Uterine sensitization-associated gene-1, gen asociado a la sensibilización uterina-1)	<ul style="list-style-type: none"> Inhibe o activa la vía Wnt dependiendo del contexto Inhibe la vía BMP (Bone morphogenetic protein, proteína morfogénica de hueso) Controla el destino de células en el riñón, dientes y pelo Las vías Wnt y BMP se han demostrado que son esenciales para el desarrollo y regeneración del páncreas 	Wnt BMP	[126-134]

<p>Tgfb3 (Transforming growth factor beta 3, factor de crecimiento de transformación beta 3)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Controla la transformación y proliferación mesenquimal y la angiogénesis durante el proceso de fusión del paladar en el desarrollo de los ratones • Regula la diferenciación de neuronas y la dinámica de la barrera sanguínea en los testículos a través de las uniones de Sertoli • Otros miembros de la familia de TGF controlan procesos de adhesión, proliferación y diferenciación; procesos que son importantes para la regeneración pancreática 	Tgf-beta	[135-141]
<p>Xbp1 (X-box binding protein 1, proteína que se une a la caja X)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Tiene un papel clave en la vía de UPR (unfolding protein response, respuesta a proteínas que no han sido plegadas correctamente) • El ratón Xbp1 knockout (con expresión de Xbp1 en el hígado para evitar su letalidad embrionaria) presenta anomalías exclusivamente en órganos con capacidad secretora como el páncreas exocrino que dan lugar a su letalidad postnatal 	UPR (Unfolding protein response, respuesta a proteínas mal plegadas)	[142, 143]
<p>Sel1h (Suppressor of lin-12-like, similar al supresor de lin-12)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Se encuentra localizado tanto en el páncreas exocrino como en el endocrino • Se ha descrito su implicación en el crecimiento de la célula beta • Inhibe la vía Notch • Puede modular la vía TGFbeta • Tanto la vía TGFbeta como Notch pueden controlar el destino celular y son esenciales para el desarrollo pancreático 	UPR (Unfolding protein response)	[144-148]
		Notch	
		Tgf-beta	

1.4.- Comprobación de los resultados obtenidos a través de los microarrays

Una vez seleccionado el grupo de genes que queríamos estudiar, su expresión se comprobó con una técnica alternativa, en nuestro caso la PCR a tiempo real (Fig. 36).

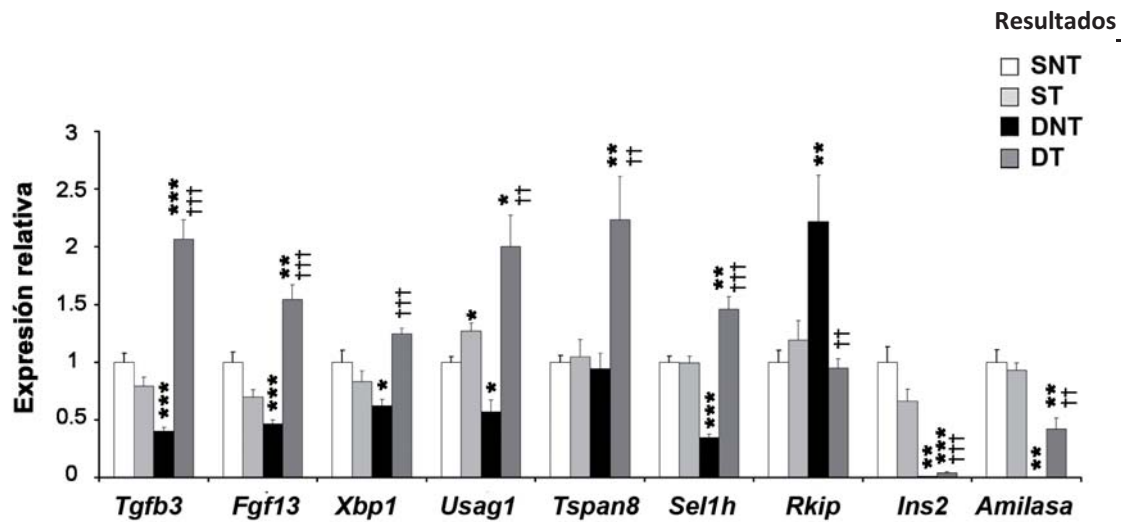


Fig. 36. Determinación de la expresión de *Tgfb3*, *Fgf13*, *Xbp1*, *Usag1*, *Tspan8*, *Sel1h*, *Rkip*, *Insulina 2* y *Amilasa* de los páncreas totales de los animales sanos no tratados (SNT), sanos tratados (ST), diabéticos no tratados (DNT) y diabéticos tratados (DT). Los resultados están normalizados respecto la expresión de *Tbp* y se expresan como las veces que cambian (fold change) respecto al grupo SNT. n=7, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ y * $p < 0,05$ vs. SNT y ++ $p < 0,01$ y +++ $p < 0,001$ vs. DNT.

1.5.- Comprobación de si los cambios observados en la expresión génica son consecuencia de los cambios en la glucemia

Los cambios observados en los animales diabéticos tratados con tungstato de sodio pueden ser debidos a un efecto del propio tungstato o a un efecto indirecto de la disminución de la de glucemia y la consiguiente disminución de la glucotoxicidad. Para descartar el efecto de la disminución de la glucemia se trató un grupo de animales diabéticos con floricina. La floricina es un compuesto extraído originalmente del manzano que inhibe la reabsorción activa de glucosa en el túbulo renal, hecho que permite la eliminación de glucosa por la orina.

1.5.1.- Comprobación de la glucemia y hemoglobina glicada en los animales tratados con floricina

Cuando se trataron los animales diabéticos con floricina se alcanzó una glucemia alrededor de 15mM (Fig. 37), la cual estaba por encima de los valores de normoglucemia (alrededor de 5mM) pero eran valores muy similares a los obtenidos por el tratamiento con tungstato de sodio, lo cual nos facilitaba la comparación.

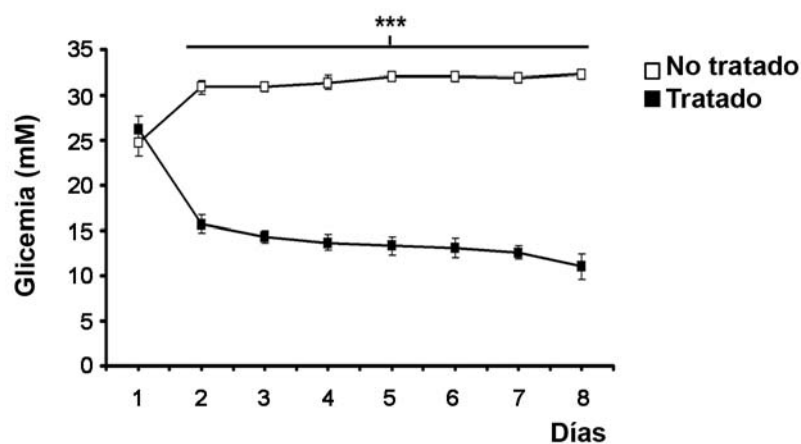


Fig. 37. Glucemia de los animales diabéticos por estreptozotocina tratados y no tratados con floricina. $n=12$, *** $p<0,001$ respecto a los animales no tratados con floricina.

Para comprobar que el tratamiento con floricina había ido correctamente, se determinó la hemoglobina glicada (HbA1c) (Fig. 38). Esta medida es indicativa de la concentración de glucosa en sangre a la cual han estado expuestos los eritrocitos, siendo ésta una valoración indirecta de la glucemia a la que han estado los animales. Así, se observó (tal como se esperaba) que los animales tratados con floricina presentaban valores inferiores de hemoglobina glicada en comparación con los animales diabéticos no tratados.

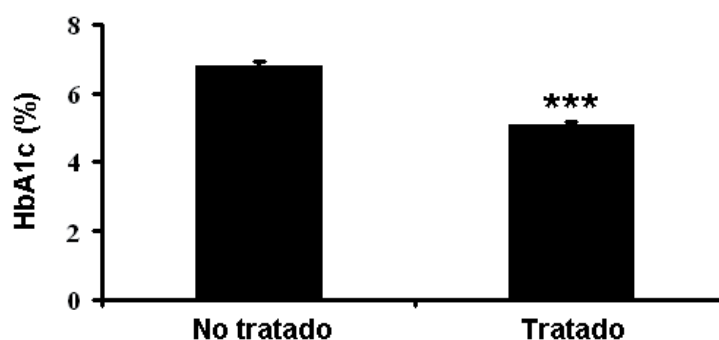


Fig. 38. Hemoglobina glicada (HbA1c) de los animales tratados y no tratados con floricina. $n=5-6$, *** $p<0,001$ respecto a los animales no tratados con floricina.

Teniendo en cuenta que el tratamiento con floricina conseguía bajar la glucemia hasta valores próximos a los valores obtenidos con el tratamiento con tungstato y que esta bajada iba acompañada de una disminución en el porcentaje de hemoglobina glicada, se consideraron estos animales como aptos para proceder a examinar la expresión de

los genes de interés en su páncreas y determinar la influencia de la recuperación de la glucemia.

1.5.2.- Determinación de la expresión de los genes de interés

Al final del tratamiento con floricina, se procedió a observar la expresión de los genes antes comprobados en los animales tratados con tungstato de sodio (Fig. 39). Los resultados demostraron que los cambios observados en los animales tratados con tungstato de sodio eran principalmente debidos al tratamiento y no a la disminución de la glucemia, ya que la mayoría de los genes examinados no variaban significativamente con el tratamiento con floricina. Las únicas excepciones fueron *Sel1h* e insulina que incrementaban significativamente (insulina incrementó $1,82 \pm 0,32$ veces, *Sel1h* incrementó $1,45 \pm 0,18$ veces, $p < 0,05$ respecto a los animales no tratados con floricina), aunque este incremento fue inferior al detectado en los animales diabéticos tratados con tungstato de sodio (insulina incrementó $4,49 \pm 1,10$ veces, *Sel1h* incrementó $4,21 \pm 0,31$ veces, $p < 0,001$ respecto a los animales diabéticos no tratados con tungstato).

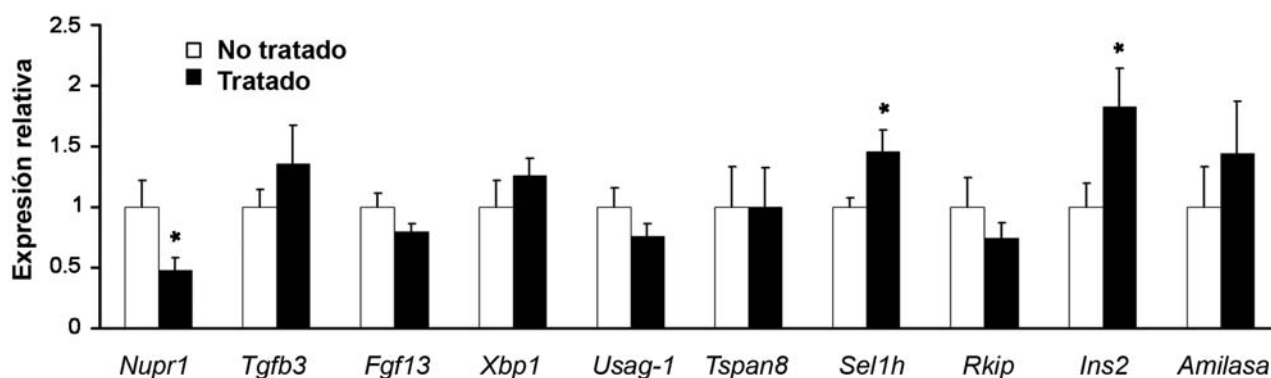


Fig. 39. Determinación de la expresión de *Nupr1*, *Tgfb3*, *Fgf13*, *Xbp1*, *Usag1*, *Tspan8*, *Sel1h*, *Rkip*, *Insulina 2* y *Amilasa* de los páncreas totales de los animales diabéticos no tratados y tratados con floricina. Los resultados están normalizados respecto a la expresión de *Tbp* y se expresan como las veces que cambia (fold change) respecto al grupo no tratado. n=10, * $p < 0,05$ vs. animales no tratados.

El gen *Nupr1* (*Nuclear protein 1*, proteína nuclear 1) se incluyó en el análisis como control positivo, ya que se describió que su expresión está regulada positivamente por la glucemia [149] y tal como se esperaba se encontró significativamente disminuido en los animales tratados con floricina. Por todo ello se concluyó que los cambios observados, en los genes examinados de los animales diabéticos tratados con tungstato de sodio, eran independientes de la disminución de la glucemia.

1.6.- Efectos sobre la proliferación de la célula beta

El aumento de la proliferación observado en los islotes de los animales diabéticos tratados con tungstato de sodio es responsable (junto con la reducción en la apoptosis) del incremento de masa de célula beta. Por ello quisimos investigar a fondo este aumento de proliferación. Así, se trataron células INS-1-E con tungstato de sodio a 100 μ M en un medio de cultivo sin suero bovino fetal y se observó un modesto incremento de la proliferación celular (Fig. 40.A), que no justificaba el aumento observado *in vivo* en los animales. Además, al crecer células INS-1-E con su medio completo (con suero bovino fetal) y suplementarlo con tungstato de sodio, no se observó ningún incremento en la proliferación, deduciendo que el tungstato de sodio no potenciaba ningún factor trófico presente en el suero. Por todo ello, se quiso examinar si el tungstato estaba actuando a través de algún mecanismo indirecto o a través de algún metabolito suyo. Para esclarecerlo, se determinó la proliferación de las células INS-1-E cuyo medio de cultivo estaba suplementado con suero de los diferentes animales, observándose un mayor incremento en las células cultivadas con el suero de los animales diabéticos tratados con tungstato de sodio (Fig. 40.B). Además, este aumento de proliferación era superior al observado cuando el medio se complementaba únicamente con tungstato de sodio. Por todo ello, concluimos que el tungstato de sodio, en los animales diabéticos tratados, actuaba sobre la proliferación de los islotes por un mecanismo indirecto modificando el perfil de los sueros.

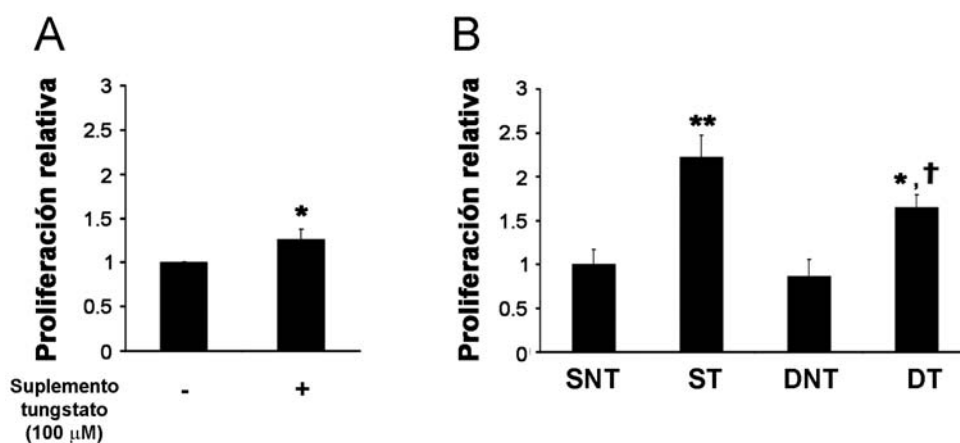


Fig. 40. Estudios de proliferación de las células INS-1-E cultivadas en presencia de tungstato de sodio (A) o suero de los diferentes grupos experimentales (B). **A.** Las células INS-1-E fueron cultivadas según se indica con o sin tungstato de sodio a 100μM en ausencia de suero bovino fetal. n = 5, * $p < 0,05$ vs. no tratadas. **B.** Las células INS-1-E fueron cultivadas en presencia de un 10% de suero de los diferentes grupos experimentales (SNT, ST, DNT y DT). n = 5. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. SNT y † $p < 0,05$ vs. DNT.

1.7.- Implicación de la vía de las MAPK en la proliferación de los islotes inducida por tungstato

Por un lado, uno de los genes que observamos disminuidos es *Rkip*, el cual se localiza específicamente en los islotes y cuya disminución da lugar a un aumento de la proliferación de las células beta, ya que disminuye su unión e inhibición a Raf-1 y aumenta la activación y fosforilación de Mek y Erk [122]. Por otro lado, se ha descrito que el tungstato es capaz de incrementar la fosforilación de Mek y Erk en hepatocitos [3]. Por todo ello, consideramos interesante estudiar la vía de las MAPK en nuestro modelo.

Al cultivar células INS-1-E en presencia de tungstato de sodio, se observó que éste inducía una activación transitoria de Erk p42/p44 a través de su fosforilación, alcanzando el máximo de activación a los 5 minutos tras complementar el medio de cultivo con tungstato. Este perfil de activación era similar al que se observaba cuando las células se cultivaban en presencia del suero de los diferentes animales, con la diferencia que la estimulación era mucho mayor que en el caso del tungstato. Además,

el suero proveniente de los animales tratados con tungstato de sodio era capaz de estimular la fosforilación de Erk p42/p44 con mayor intensidad y durante más tiempo que el suero de los animales no tratados con tungstato de sodio (Fig. 41).

De esta forma, las diferencias observadas en los perfiles de activación de Erk p42/p44 son similares a las diferencias determinadas en los patrones de proliferación. Así, el suero de los animales tratados con tungstato de sodio es capaz de estimular con mayor intensidad la proliferación y la fosforilación de Erk p42/p44 que el suero de los animales no tratados y que el propio tungstato. Por lo tanto, parecería que existe una correlación entre la activación de la cascada de MAPK y la proliferación inducida por el suero de los animales. Para confirmar dicha hipótesis, se cultivaron las células INS-1-E en presencia del suero de los animales tratados y no tratados con tungstato de sodio junto con la presencia del inhibidor de Mek PD-98059; observándose una disminución de la proliferación del 62% ($p < 0.05$ vs. células no tratadas con el inhibidor, $n=6$) en el caso del suero de los animales tratados con tungstato y del 8% ($p = \text{no significativa}$ vs. células no tratadas con el inhibidor, $n=6$) en el caso de los animales no tratados.

Todos estos datos sugieren que el tungstato de sodio, ejerce sus efectos sobre la replicación de la célula beta, activando la vía de las MAPK a corto término (activación directa aumentando su fosforilación) y a largo término (disminuyendo la expresión del inhibidor de la activación de la vía, *Rkip*), posiblemente a través de un mecanismo indirecto que incluiría la metabolización del propio tungstato y/o la estimulación de algún factor trófico.

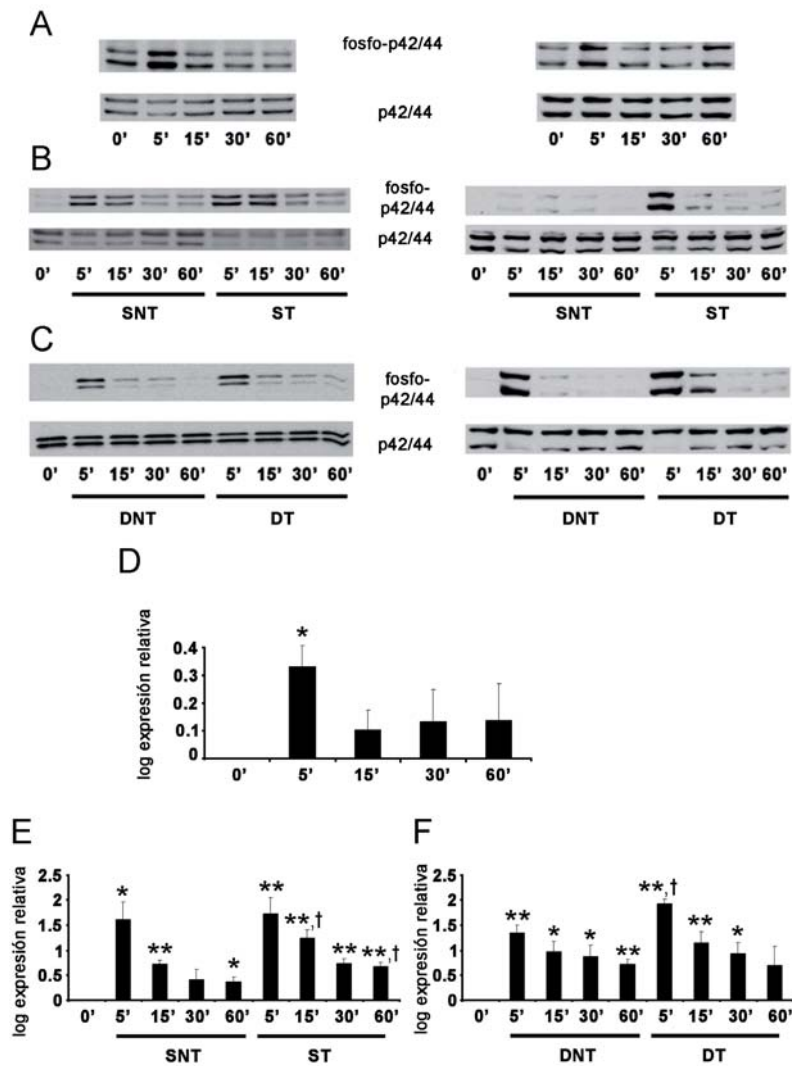


Fig. 41. Estudios de la fosforilación de p42/p44 en las células INS-1-E cultivadas en presencia de tungstato de sodio (**A**, **D**) o suero de los diferentes grupos experimentales (**B-C**, **E-F**). **A-C**. Imágenes representativas de Western blots obtenidos de células INS-1-E cultivadas durante los minutos DT indicados con tungstato de sodio 100 μ M (**A**), suero proveniente de los animales sanos no tratados (SNT) o tratados con tungstato de sodio (ST) (**B**), suero proveniente de los animales diabéticos no tratados (DNT) o tratados (DT) (**C**) y expuestos al anticuerpo indicado (anti-fosfo-p42/p44 o anti-p42/p44 total). **D-F**. Cuantificación de los diferentes Western blots (**D** para las células tratadas con tungstato y **E-F** para las células tratadas con sueros) expresada como el logaritmo de las veces que cambia (log fold change) la proteína fosforilada p42/p44 normalizada por la cantidad total de proteína p42/p44 para cada punto respecto al punto del tiempo 0. ** $p < 0,01$ y * $p < 0,05$ vs. tiempo 0 y † $p < 0,05$ DT vs. DNT en el mismo tiempo. n=4-5.

2. PAPEL DE Tmem27 EN LA SECRECIÓN DE INSULINA, PROLIFERACIÓN BETA PANCREÁTICA Y POSIBLE USO COMO MARCADOR DE MASA BETA PANCREÁTICA

2.1.- Expresión de *Tmem27* en los islotes de las ratas sanas tratadas y no tratadas con tungstato de sodio

Teniendo en cuenta que disponíamos de un modelo animal de regeneración pancreática, quisimos aprovechar este modelo para comprobar la utilidad de *Tmem27* como marcador de proliferación de las células beta pancreáticas. Considerando que por un lado los islotes de las ratas sanas tratadas con tungstato presentan una proliferación elevada y que, por otro lado, la proteína de transmembrana 27 (*Tmem27*) ha sido implicada en fenómenos de replicación de las células beta [54] esperábamos observar la expresión de *Tmem27* incrementada en los islotes de los animales tratados con tungstato de sodio. Sorprendentemente, la expresión de *Tmem27* en los islotes de los animales sanos tratados con tungstato de sodio no estaba aumentada, sino que estaba disminuida (Fig. 42).

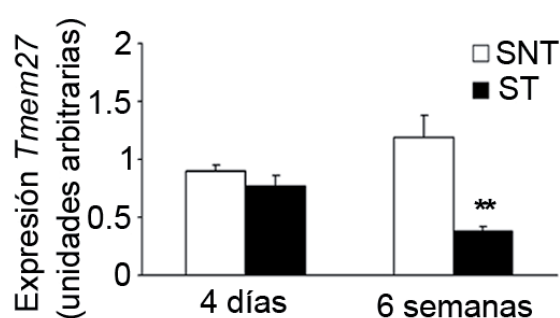


Fig. 42. Los islotes de las ratas sanas tratadas con tungstato de sodio expresan en menor cantidad *Tmem27*. Expresión de *Tmem27* en los islotes de las ratas sanas no tratadas (SNT) y tratadas (ST) con tungstato de sodio por el tiempo indicado. n=5-6, ** $p < 0,01$ vs. SNT.

Ante esta situación y observando que *Tmem27* también podría estar implicado en procesos de secreción de insulina [99], quisimos caracterizar en más detalle los animales sanos tratados con tungstato.

2.2.- Caracterización de la secreción de insulina estimulada por glucosa en los islotes de los animales sanos tratados con tungstato de sodio

Se determinó la secreción de insulina frente a un estímulo de glucosa en islotes aislados provenientes de animales sanos no tratados (SNT) y tratados (ST), observándose que tras estimular los islotes con concentraciones elevadas de glucosa, la secreción de insulina de los islotes provenientes de los animales ST estaba disminuida en comparación a los islotes de los animales SNT (Fig. 43). Esta disminución concordaría con la disminución de la expresión de Tmem27 establecida en los islotes de los animales ST y un posible papel de Tmem27 en procesos de secreción de insulina.

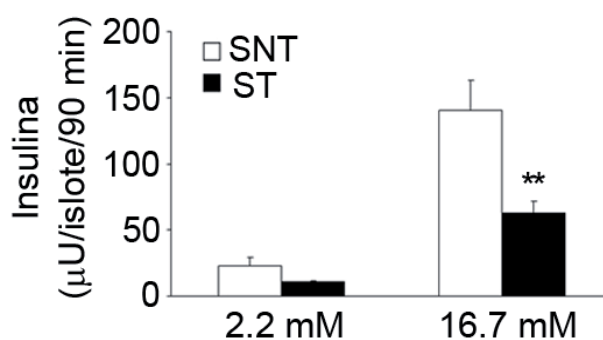


Fig. 43. Secreción estática de insulina en islotes aislados de animales SNT y ST. Insulina secretada tras cultivar los islotes extraídos de los animales SNT y ST a la concentración de glucosa indicada. n=6, ** $p < 0,01$ islotes provenientes de ratas ST vs. islotes provenientes de ratas SNT, ambos tratados a 16,7 mmols/l glucosa.

2.3.- Caracterización fenotípica de las ratas sanas tratadas con tungstato de sodio

Teniendo en cuenta que los animales SNT y ST no presentan diferencias en su glucemia pero si en la secreción de insulina estimulada por glucosa, procedimos a estudiar si los animales tratados con tungstato de sodio presentaban una mejora en la tolerancia a la glucosa y en la sensibilidad a la insulina. Así, procedimos a examinar estos parámetros, observando que las ratas tratadas con tungstato de sodio presentaban una mayor tolerancia a la glucosa (Fig. 44.A-B) y una mayor sensibilidad a la insulina (Fig. 44.C).

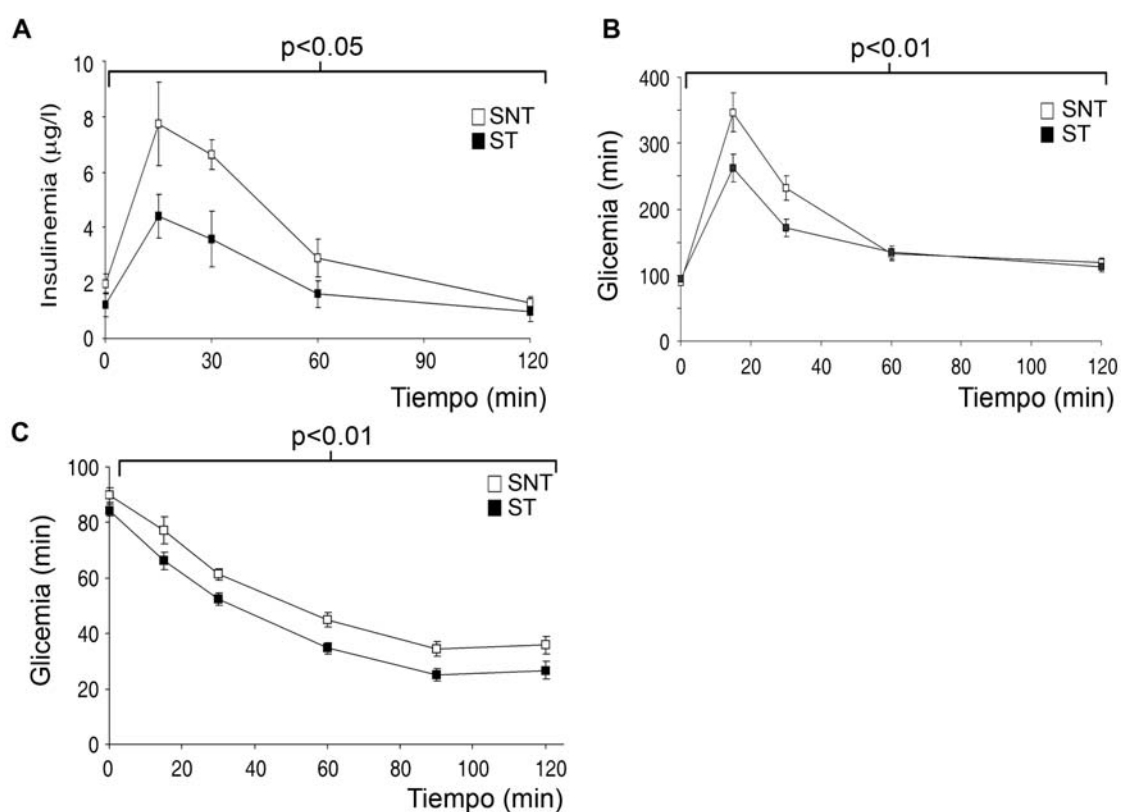


Fig. 44. Test de tolerancia intraperitoneal a la glucosa y de sensibilidad a la insulina. **A-B.** Insulinemias (**A**) y glucemias (**B**) de los animales sanos no tratados (SNT) y tratados (ST) tras administrarles glucosa por vía intraperitoneal (2g glucosa/Kg animal). $n=10$. **C.** Evolución de la glucemia de los animales sanos no tratados (SNT) y tratados (ST) tras administrarles insulina por vía intraperitoneal (1 UI/Kg animal). $n=13-17$.

2.4.- Expresión de insulina en los islotes de las ratas sanas tratadas y no tratadas con tungstato de sodio y correlación con Tmem27

A continuación, tras observar que la insulinemia (Fig. 20.A) y la secreción de insulina estimulada por glucosa de los islotes de las ratas sanas tratadas con tungstato de sodio (Fig. 43) estaban disminuidas, nos preguntamos qué estaba sucediendo con la expresión de *insulina*, por lo que procedimos a determinarla. Así, observamos que los islotes de las ratas ST presentaban una expresión de insulina inferior a la que presentaban las ratas no tratadas (Fig. 45.A). Además, existía una correlación positiva y significativa entre la expresión de *insulina* y *Tmem27* (Fig. 45.B), lo que continuaba apuntando hacia la implicación de *Tmem27* en procesos de secreción de insulina.

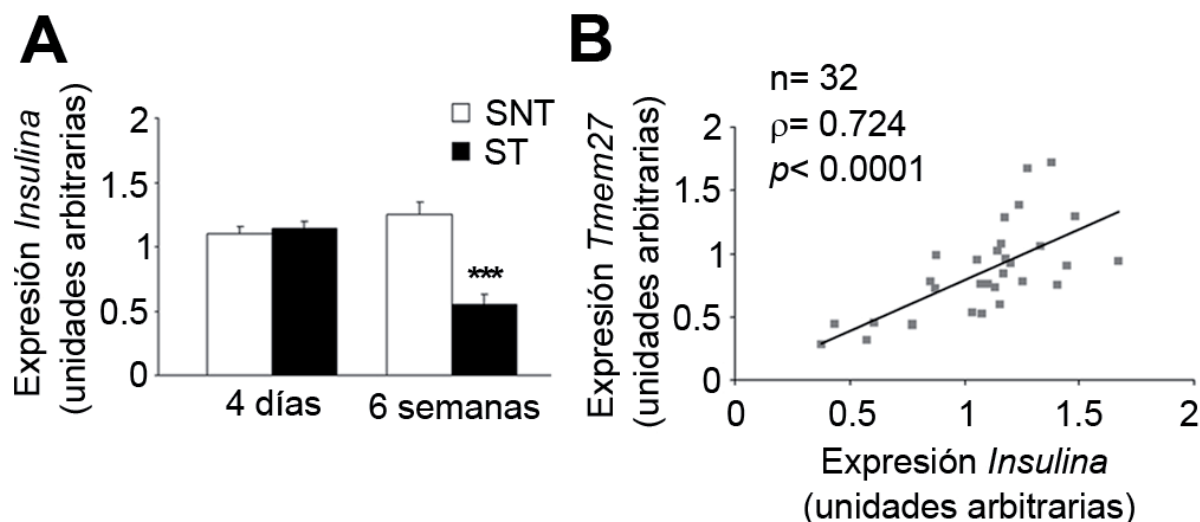


Fig. 45. Los islotes de las ratas sanas tratadas con tungstato de sodio expresan en menor cantidad *insulina* y presentan una correlación significativa entre *Tmem27* e *insulina*. **A:** Expresión de insulina en los islotes de las ratas sanas no tratadas (SNT) y tratadas (ST) con tungstato de sodio por el tiempo indicado. $n=5-6$, *** $p < 0,001$ vs. SNT. **B:** Expresión de *Tmem27* e *insulina* para las mismas muestras, presentando en los resultados la recta de regresión obtenida, el número de muestras examinadas (n), el coeficiente de correlación por el test de rangos de Spearman (ρ) y la p asociada.

Nuestros resultados obtenidos en las ratas sanas tratadas con tungstato de sodio, apuntan hacia un papel de *Tmem27* en la secreción de insulina, pero las conclusiones que se pueden extraer de este estudio son limitadas y requieren más experimentos para esclarecer el papel de *Tmem27* en el páncreas endocrino. Por ello, estudiamos la localización de *Tmem27* en el páncreas, su expresión en islotes humanos y realizamos estudios de sobreexpresión en líneas celulares e islotes.

2.5.- Localización de *TMEM27*

Procedimos a colocalizar *TMEM27* con las diferentes hormonas presentes en el páncreas humano por inmunohistoquímica, observando que, tal como se había descrito [54, 99], su expresión quedaba limitada a las células beta (Fig. 46):

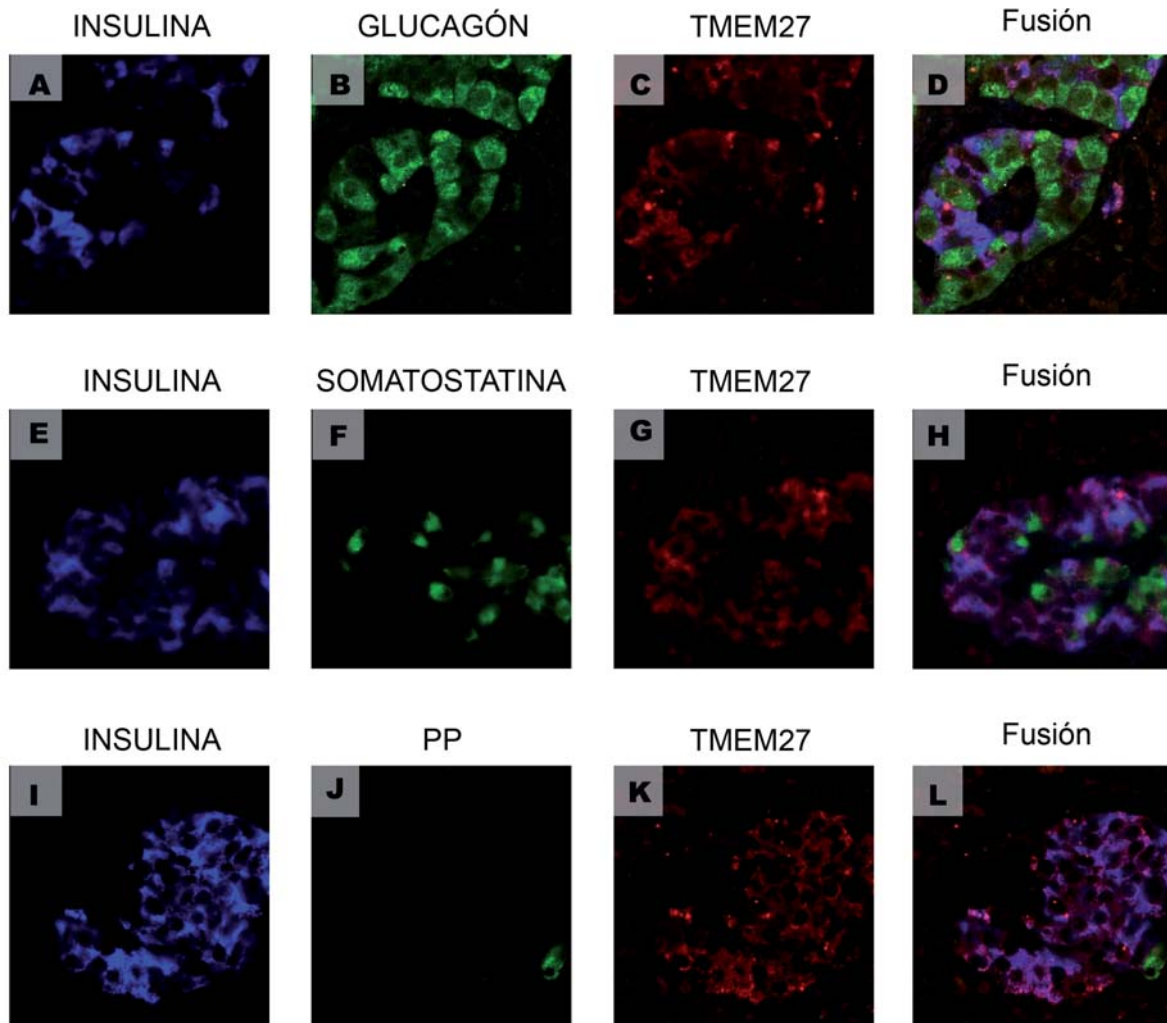


Fig. 46. TMEM27 se expresa principalmente en las células beta en el páncreas humano. Imágenes representativas en que por inmunohistoquímica se detecta la presencia de insulina (A, E, I), glucagón (B), somatostatina (F), polipéptido pancreático (PP, J) y TMEM27 (C, G, K) en el páncreas humano. A la derecha de cada línea (D, H, L) se presenta la fusión de las imágenes de la misma línea. Todas las imágenes se tomaron a 40 aumentos.

Además, comprobamos la expresión de TMEM27 en el riñón humano por colocalización con el marcador de túbulo proximal FBPasa (fructosa-1,6-bisfosfatasa 2), observando que la expresión de TMEM27 se restringía a este tipo celular (tal como se había descrito anteriormente [96, 97]) (Fig. 47)

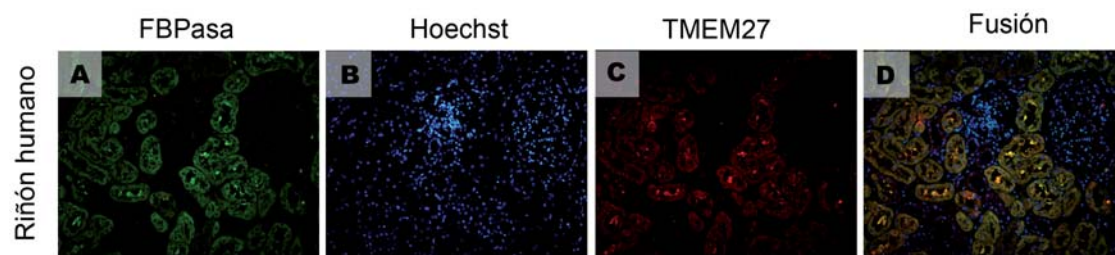


Fig. 47. *TMEM27* se expresa principalmente en las células proximales tubulares en el riñón humano. Imágenes representativas en que por inmunohistoquímica se detecta la presencia de FBPasa (marcador de células tubulares proximales, **A**), Hoechst (marcador nuclear, **B**), y *TMEM27* (**C**) en el riñón humano. A la derecha de la línea (**D**) se presenta la fusión de las imágenes de la misma línea. Todas las imágenes se tomaron a 20 aumentos.

2.6.- Expresión de *TMEM27* en islotes de páncreas humanos provenientes de donantes sin y con diabetes

Los pacientes con diabetes de tipo 2 presentan una resistencia al efecto de la insulina, que suele ir acompañada de una disminución en la secreción de insulina y en último término de una disminución en la masa de célula beta pancreática. Teniendo en cuenta que *TMEM27* podría participar en procesos de proliferación o secreción de insulina, su expresión se debería ver modificada en los islotes de los donantes con diabetes de tipo 2. Así, al examinar la expresión *TMEM27* en islotes provenientes de donantes sin y con diabetes de tipo 2, observamos que la expresión de *TMEM27* estaba disminuida en los islotes de los donantes con diabetes de tipo 2 (Fig. 48):

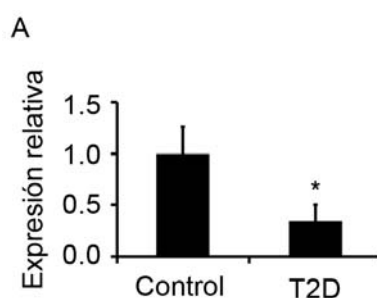


Fig. 48. *TMEM27* se haya disminuido en islotes de donantes con diabetes de tipo 2. Expresión de *TMEM27* en islotes provenientes de donantes sin (control) o con diabetes de tipo 2 (T2D). n=8-3 (sanos y T2D respectivamente). * $p < 0,05$ vs. control.

2.7.- Localización de TMEM27 en páncreas humanos provenientes de donantes sin y con diabetes

Teniendo en cuenta la disminución de la expresión de TMEM27 en los islotes provenientes de donantes con diabetes de tipo 2, nos preguntamos si esta disminución vendría acompañada de una distinta localización de TMEM27 en el páncreas. Por ello, procedimos a colocalizar TMEM27 con insulina en el páncreas humano, observando que la expresión de TMEM27 continuaba restringida a las células beta (Fig. 49):

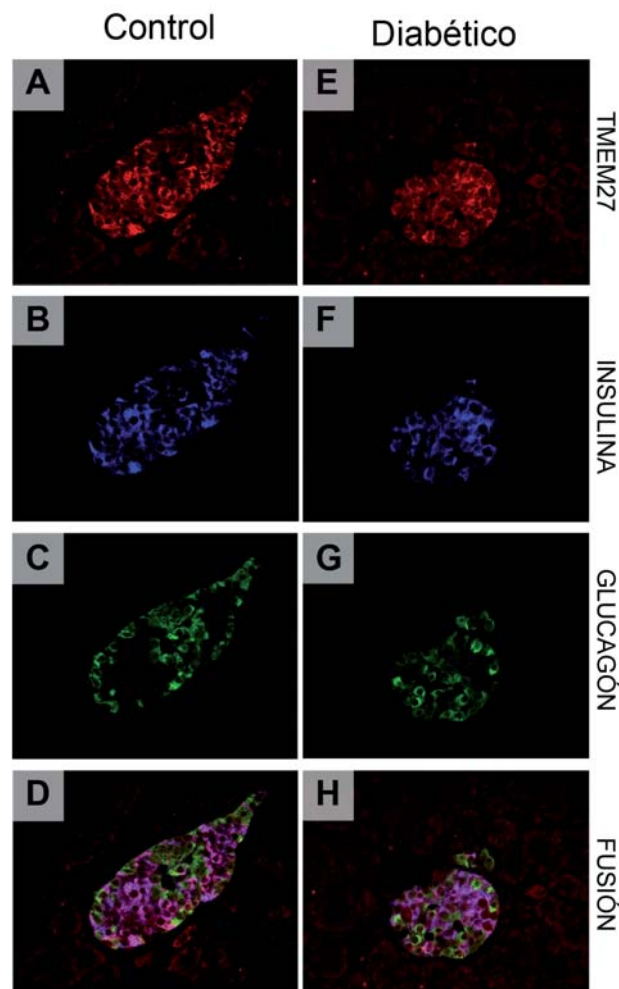


Fig. 49. TMEM27 se expresa principalmente en las células beta en el páncreas humano sin y con diabetes de tipo 2. Imágenes representativas en que por inmunohistoquímica se detecta la presencia de TMEM27 (**A**, **E**), insulina (**B**, **F**) y glucagón (**C**, **G**) en el páncreas humano. En la parte inferior de cada columna (**D**, **H**) se presenta la fusión de las imágenes de la misma columna. Todas las imágenes se tomaron a 40 aumentos.

2.8.- Correlación entre la expresión de *Tmem27* y la expresión de genes implicados en la secreción de insulina o en la progresión del ciclo celular en islotes humanos

Para realizar una primera aproximación a la función de *TMEM27* en el páncreas humano, determinamos la expresión de genes relacionados con la secreción de insulina (*INSULINA* y *ESNAPINA*) y con la progresión del ciclo celular (*CDK6* [*cyclin dependent kinase 6*, quinasa dependiente de ciclina 6], *CDK2*, *CICLINA E1* y *CICLINA D1*) en islotes provenientes de donantes humanos sin patología pancreática, estableciendo su correlación con la expresión de *TMEM27* (Fig. 50).

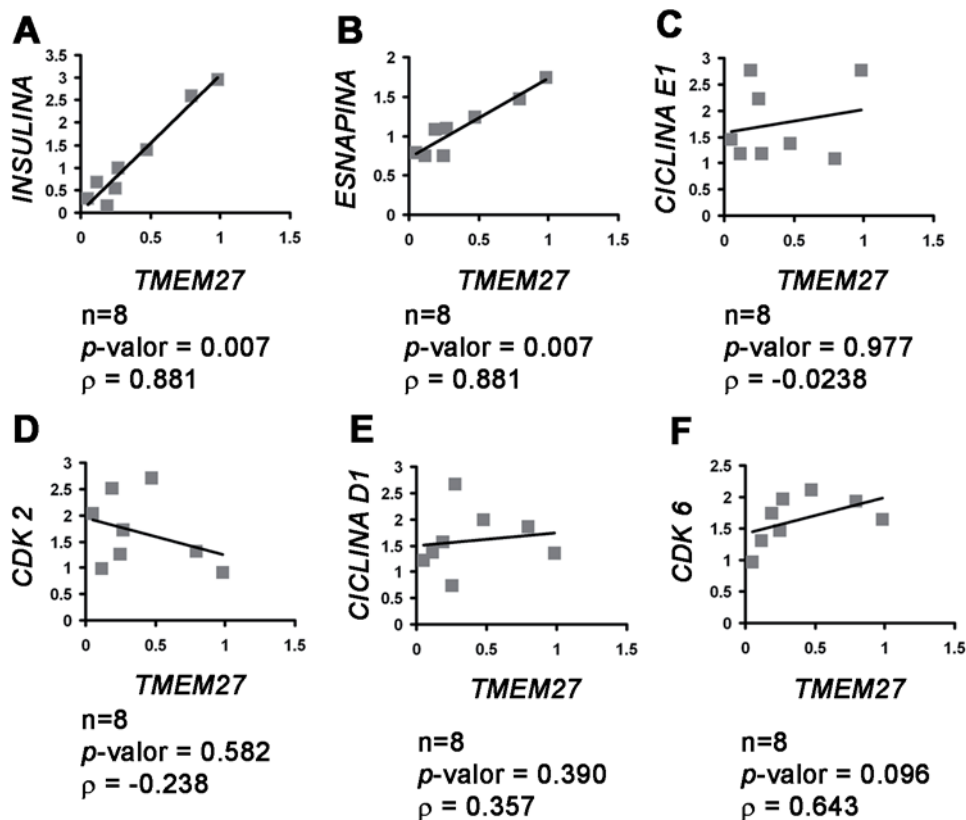


Fig. 50. La expresión de *TMEM27* correlaciona con *INSULINA* y *ESNAPINA*, pero no con genes implicados en la progresión del ciclo celular en islotes humanos. Se extrajo RNA total de islotes aislados de 8 donantes de páncreas sin patología pancreática y se examinó la expresión de los genes indicados por PCR a tiempo real. Las gráficas muestran las correlaciones, el coeficiente de correlación de rangos de Spearman (ρ) y su p valor asociado entre la expresión de *TMEM27* y la expresión de *INSULINA* (A), *ESNAPINA* (B), *CICLINA E1* (C), *CDK2* (D), *CICLINA D1* (E) y *CDK6* (F).

Así, se observó que *TMEM27* presentaba una correlación positiva y significativa con *INSULINA* (Fig. 50.A) y *ESNAPINA* (Fig. 50.B) (proteína relacionada con el complejo SNARE y cuya interacción con Tmem27 había sido descrita previamente [99]). Además, como era de esperar, *ESNAPINA* e *INSULINA* presentaron también una correlación significativa y positiva (Fig. 51). Por otro lado, no se encontró una correlación significativa entre *TMEM27* y los genes implicados en la progresión del ciclo celular (Fig. 50.C-F). Todo ello apuntaba a que Tmem27 jugaba un papel en procesos de secreción de insulina.

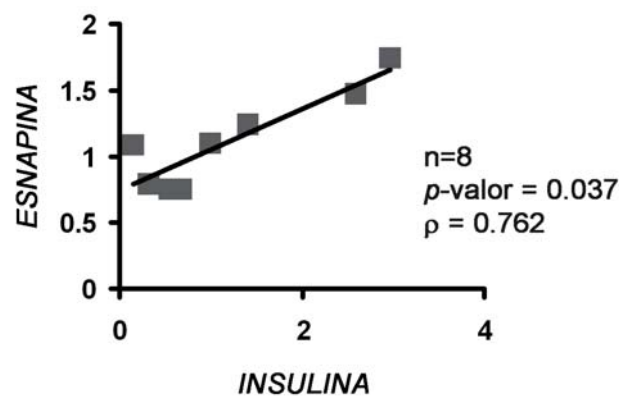


Fig. 51. La expresión de *ESNAPINA* correlaciona con *INSULINA* en islotes humanos. Se extrajo RNA total de islotes aislados de 8 donantes de páncreas sin patología pancreática y se examinó la expresión de los genes indicados por PCR a tiempo real. La gráfica muestra la correlación, el coeficiente de correlación de rangos de Spearman (ρ) y su p valor asociado entre la expresión de *ESNAPINA* y la expresión de *INSULINA*.

2.9.- Estudios de sobreexpresión de Tmem27

Las aproximaciones realizadas hasta el momento tan solo nos podían sugerir el papel de Tmem27 en la célula beta, pero no podían definir claramente el rol de esta proteína. Por ello, decidimos sobreexpresar esta proteína en cultivos celulares de una línea de célula beta y en islotes.

2.9.1.- Patrón de Tmem27 en diferentes especies

Leyendo detenidamente los dos artículos que exponían el papel de Tmem27 en los islotes [54, 99], nos percatamos que cada grupo había clonado y sobreexpresado Tmem27 de diferentes especies. Mientras Fukui y colaboradores [99] clonaron TMEM27 de material humano, Akpinar y colaboradores [54] clonaron Tmem27 de ratón. Por ello, nos preguntamos si quizás las diferentes conclusiones a las que llegaron fueron debidas a que en cada especie Tmem27 estuviera manifestando un efecto diferente.

A nivel de secuencia, las proteínas de Tmem27 de rata, ratón y humano presentaban una elevada homología (Fig. 52) y su localización pancreática en las diferentes especies se restringía a las células beta (Fig. 53), pero se observaron diferencias al observar el patrón que presentaban por Western Blot (Fig. 54.A). Además, al clonar Tmem27 de estas especies y sobreexpresarlos en células INS-1 832/13 a través de adenovirus, observamos que cada adenovirus daba lugar a un patrón de bandas por Western Blot diferente (Fig. 54.B). Por todo ello, concluimos que las diferencias observadas son debidas a modificaciones post-traduccionales, consecuencia de diferencias en la secuencia primaria (al sobreexpresar Tmem27 de las diferentes especies en las mismas células se observaron diferentes bandas).

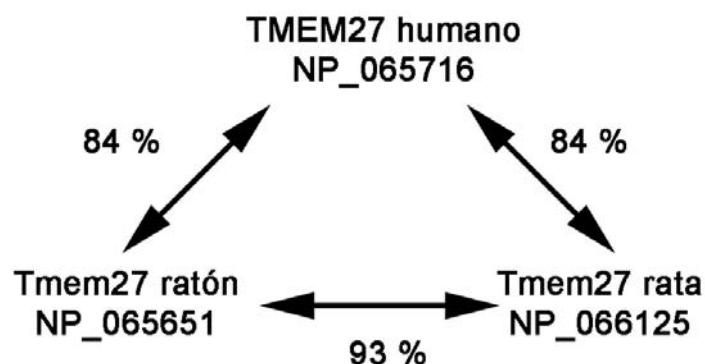


Fig. 52. Tmem27 presenta una elevada homología entre las especies estudiadas. Homología en las secuencias de aminoácidos de Tmem27 de rata, ratón y humano según el programa Blast.

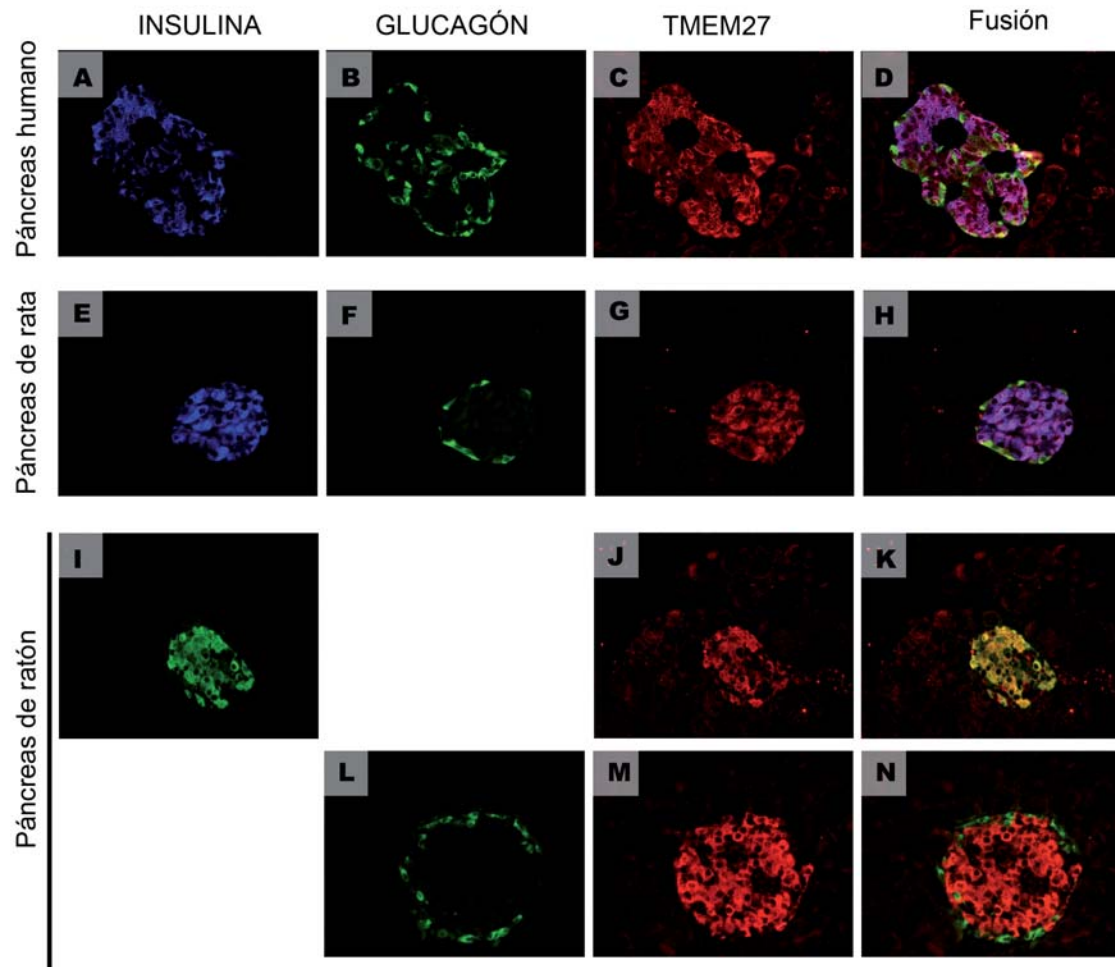


Fig. 53. La localización pancreática de Tmem27 en rata, ratón y humano se restringe a las células beta. Imágenes representativas en que por inmunohistoquímica se detecta la presencia de insulina (**A, E, I**), glucagón (**B, F, L**), y TMEM27 (**C, G, J, M**) en el páncreas humano (**A-D**), de rata (**E-H**) y ratón (**I-N**). A la derecha de cada línea (**D, H, K** y **N**) se presenta la fusión de las imágenes de la misma línea. Todas las imágenes se tomaron a 40 aumentos.

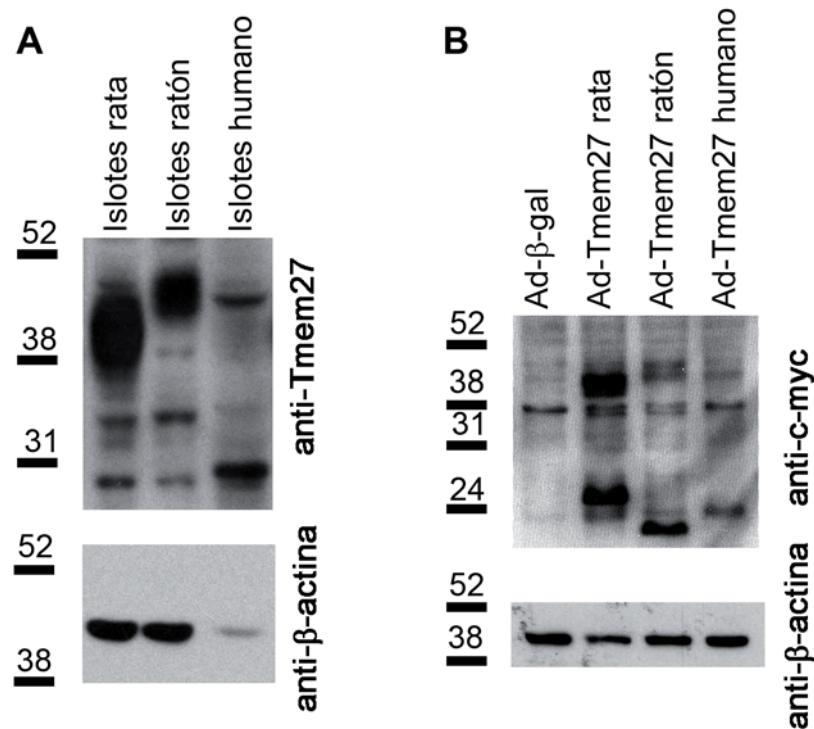


Fig. 54. Tmem27 de rata, ratón y humano presenta diferente peso molecular por Western Blot. **A.** Western Blot contra Tmem27 (panel superior) o β -actina (panel inferior) de extractos proteicos de islotes de rata, ratón y humano. **B.** Western Blot contra c-myc (panel superior) o β -actina (panel inferior) de extractos proteicos de células INS-1 832/13 infectadas con adenovirus expresando β -gal (control) o Tmem27 de rata, ratón o humano con una cola c-myc unida al extremo C-terminal.

2.9.2.- Efectos de la sobreexpresión de Tmem27 en células INS-1 832/13

Para esclarecer si el diferente patrón de bandas observado por Western Blot de Tmem27 clonado de diferentes especies tenía como consecuencia un cambio en su funcionalidad, se infectaron células INS-1 832/13 con los diferentes adenovirus. De esta forma se observó que Tmem27 provocaba un aumento en la secreción de insulina inducida por glucosa (Fig. 55.A) y un ligero aumento en la proliferación (Fig. 55.B), el cual no dio lugar a un aumento significativo en el número de células (Fig. 55.C). Además, observamos que los diferentes adenovirus que sobreexpresaban Tmem27 proveniente de diferentes especies tenían un efecto similar sobre la secreción de insulina y la proliferación celular, de forma que aunque presentaban diferencias en el patrón de bandas por Western Blot ejercían una función similar.

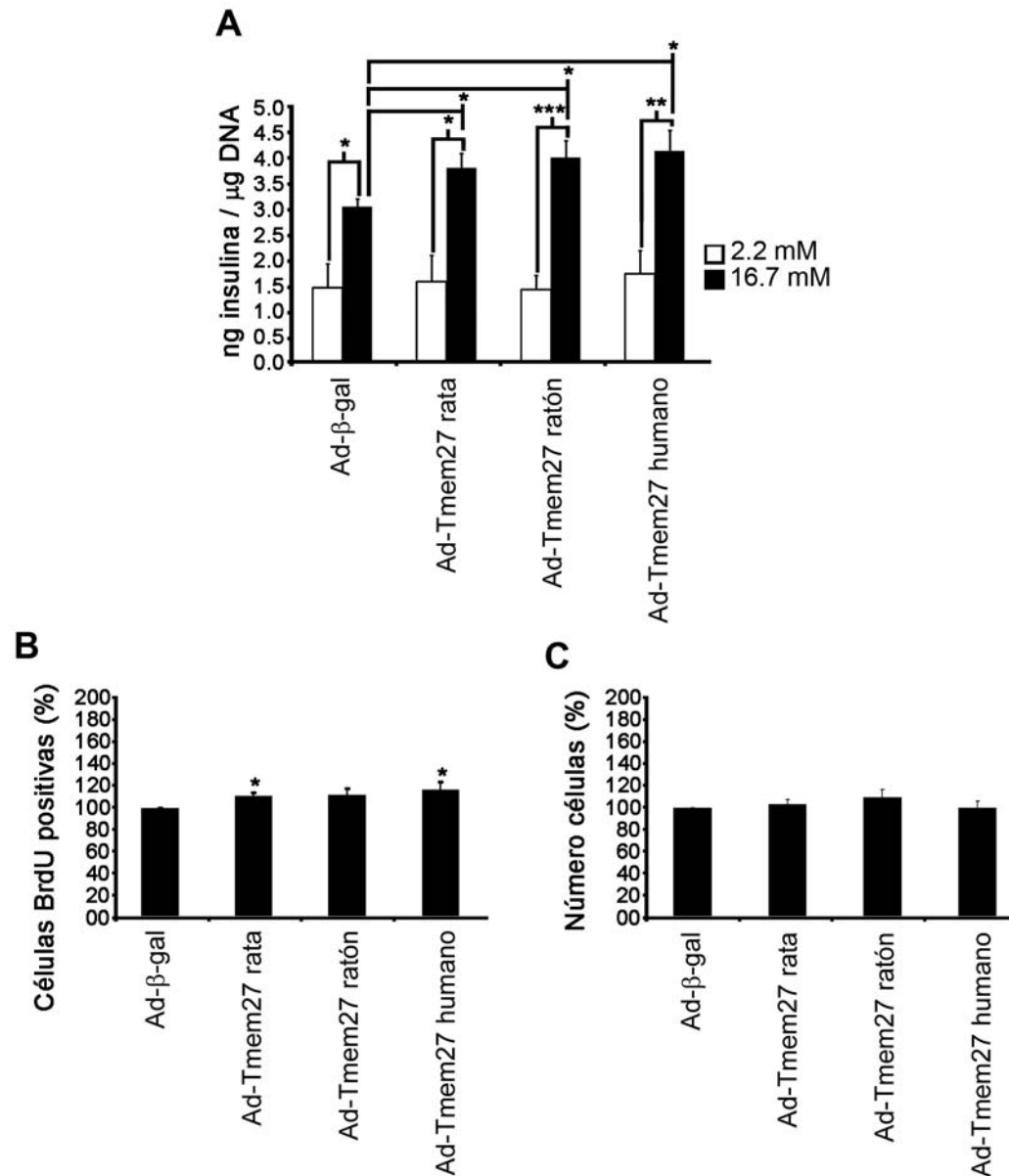


Fig. 55. Tmem27 de rata, ratón y humano ejercen efectos similares sobre las células INS-1 832/13. **A:** Secreción de insulina en células INS-1 832/13 estimuladas a la concentración de glucosa indicada e infectadas con el correspondiente adenovirus. $n=4$, * $p<0,05$, ** $p<0,01$ y *** $p<0,001$. **B:** Replicación de las células INS-1 832/13 infectadas con los adenovirus indicados y expresada como el porcentaje relativo respecto al adenovirus Ad- β -gal. $n=6$, * $p<0,05$ vs. Ad- β -gal (Ad-Tmem27 ratón, $p=0,06$). **C:** Número de células 48 horas después de la infección con los adenovirus, expresado como el porcentaje relativo respecto al adenovirus Ad- β -gal. $n=6$.

2.9.3.- Efectos de la sobreexpresión de Tmem27 en cultivos primarios de islotes

El siguiente paso fue reconfirmar los efectos observados sobre las células INS-1 832/13 en cultivos primarios de islotes ya que las células inmortalizadas y mantenidas en cultivos pueden presentar ciertas aberraciones que den lugar a comportamientos anómalos. Por ello, los mismos experimentos fueron repetidos en cultivos primarios de islotes de rata. Así, se infectaron islotes de rata con Tmem27 clonado de rata, observándose de nuevo que esta sobreexpresión daba lugar a un incremento en la secreción de insulina inducida por glucosa, pero sin que se modificasen los niveles de proliferación (Fig. 56).

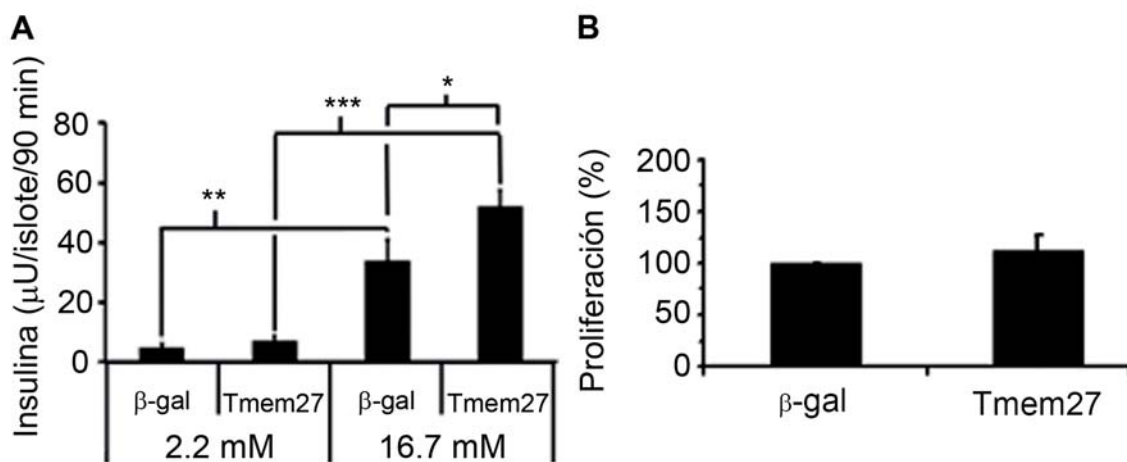


Fig. 56. La sobreexpresión de Tmem27 en islotes de rata incrementa la secreción de insulina inducida por glucosa sin afectar la proliferación. **A:** Secreción de insulina a 2.2 o 16.7 mmols/l de glucosa en islotes de rata sobreexpresando Tmem27 de rata o β-gal como control. $n=7-9$, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ y $***p < 0,001$. **B:** Proliferación celular medida como la incorporación de [3 H-metil] timidina en cuentas por minuto (cpm) en islotes de rata sobreexpresando Tmem27 de rata o β-gal como control. Los resultados se muestran como el incremento porcentual de la proliferación de los islotes infectados con Tmem27 respecto a los islotes infectados con β-gal, $n=5$.

2.10.- Uso potencial de Tmem27 como marcador de masa de células beta

Tal como fue descrito y hemos observado, Tmem27 se expresa dentro del páncreas de forma exclusiva en las células beta ([54, 99] y Fig. 46) y dentro del riñón en las células tubulares proximales ([96, 97] y Fig. 47). Según el estudio de Akpinar y colaboradores

[54], Tmem27 es una proteína de transmembrana que se escinde únicamente en las células beta. Además, demuestran que esta escisión es constante e independiente de la glucosa circulante. Por todo ello, concluyen que la parte extracelular de Tmem27 es proporcional a la masa de célula beta y proponen su cuantificación como una medida indirecta de la masa de célula beta existente.

Para comprobar dicha hipótesis, quisimos observar si la escisión de Tmem27 era realmente exclusiva de la célula beta, realizando estudios de escisión en los dos tipos celulares que expresan Tmem27: células beta pancreáticas y células tubulares proximales renales. Para ello, tal como se muestra en el esquema de la Fig. 57, disponíamos de dos anticuerpos: uno que reconocía el extremo N terminal de la proteína, de forma que detectaba la proteína total y la parte de la proteína que era liberada al espacio extracelular tras la escisión, y otro anticuerpo que detectaba la secuencia myc fusionada al extremo C terminal de la proteína Tmem27 sobrexpresada, lo que significaba que detectaba la proteína total y la parte de Tmem27 que permanecía anclada a la membrana citoplasmática tras la escisión.

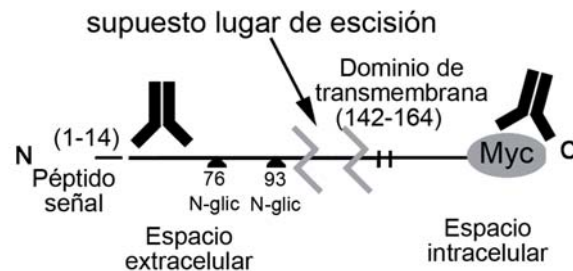


Fig. 57. Esquema de la proteína Tmem27. Se observa el supuesto lugar de escisión, los residuos N-glicosilados y las partes de las proteínas reconocidos por los anticuerpos utilizados: un anticuerpo contra el extremo N-terminal, que reconoce la proteína completa y el fragmento liberado al espacio extracelular tras la escisión, y un anticuerpo contra el fragmento c-myc fusionado en el extremo C terminal, de forma que reconoce la proteína total y la parte de la proteína que permanece anclada a la membrana tras la escisión.

2.10.1.- Caracterización de las bandas observadas por Western Blot correspondientes a Tmem27

A continuación, procedimos a caracterizar las múltiples bandas que se observaban al inmunodetectar Tmem27, en un extracto total de proteínas de células INS-1 832/13 infectadas con Ad-Tmem27, a través del tratamiento de este extracto proteico con enzimas que eliminasen las modificaciones post-traduccionales del tipo N-glicanos (Fig. 58.A), heparinas (Fig. 58.B) o fosforilaciones (Fig. 58.C). Así, observamos que Tmem27 estaba N glicosilado, pero no presentaba colas de heparina ni fosforilaciones. Además, al tratar con N glicosidasa el extracto total de proteínas, las bandas superiores disminuían su peso molecular hasta los 25kDa, mientras que la banda más pequeña no modificaba su tamaño. Con ello deducimos que Tmem27 estaba principalmente N glicosilado, ya que al eliminar estos residuos, observábamos que las bandas superiores reducían su peso molecular hasta un peso similar al teórico (27kDa). Además, observamos una banda por debajo de 25kDa, que no se modificó en ninguno de los casos, la cual suponemos que es la banda descrita por Akpınar y colaboradores [54], correspondiente al fragmento de Tmem27 que permanece anclado a la membrana tras su rotura.

Para confirmar este hecho, procedimos a inmunodetectar Tmem27 en extractos proteicos de células INS-1 832/13 infectadas con Ad-Tmem27, realizando una observación cada 2 horas tras la infección (Fig. 59). Así, 16 horas después de la infección comenzamos a detectar la expresión de Tmem27 en forma de 2 bandas con tamaño superior al teórico (27kDa), que supuestamente corresponderían a una forma inmadura y a una forma madura de Tmem27. A las 20 horas tras la infección, comenzamos a detectar una banda de peso molecular inferior al peso teórico y que correspondería a la parte de Tmem27 que quedaría anclada en la membrana citoplasmática después de su rotura.

De esta forma, concluimos que la banda inferior que se observa con el anticuerpo c-myc en células infectadas con el Ad-Tmem27 corresponde a la parte de Tmem27 que permanece anclada a la membrana tras la escisión.

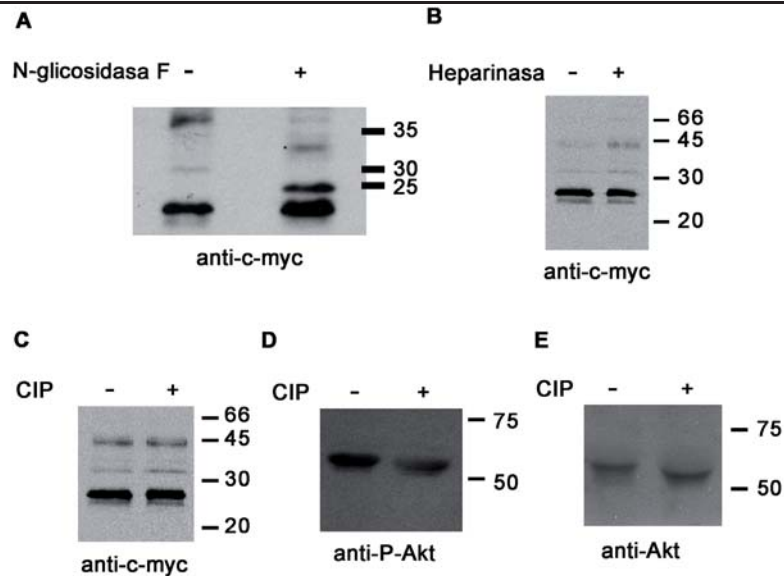


Fig. 58. Modificaciones post-traduccionales de Tmem27 en INS-1 832/13. **A.** Extractos proteicos de células INS-1 832/13 infectadas con Ad-Tmem27-myc, tratados con N-glicosidasa-F e inmunodetectados con anti c-myc. **B.** Extractos proteicos de células INS-1 832/13 infectadas con Ad-Tmem27-myc, tratados con Heparinasa I e inmunodetectados con anti c-myc. **C-E:** Extractos proteicos de células INS-1 832/13 infectadas con Ad-Tmem27-myc, tratados con fosfatasa intestinal alcalina de becerro (CIP) e inmunodetectados con anti c-myc (**C**), fosfo-Ser-Akt (**D**) o Akt (**E**). **D-E** se incluyen como controles positivos de desfosforilación.

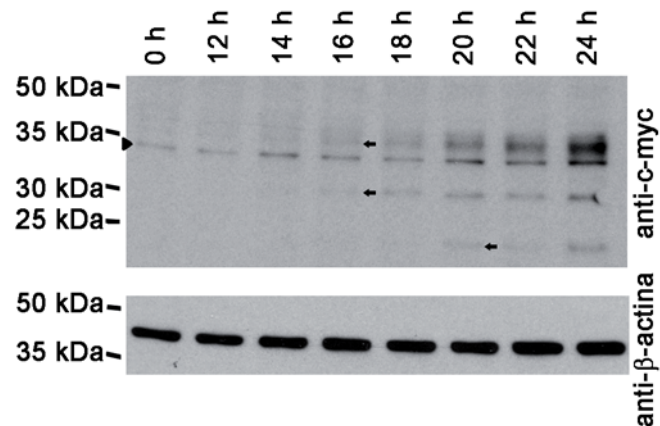


Fig. 59. Expresión de Tmem27 a diferentes horas tras la infección de INS-1 832/13 con Ad-Tmem27. En el eje de las abscisas se representan las horas tras la infección en que se recogieron los extractos proteicos. El panel superior fue inmunodetectado con el anticuerpo contra c-myc y el inferior contra β -actina (control de carga). Las múltiples bandas correspondientes a Tmem27 se marcaron con una flecha en el momento de su aparición. Algunas veces se detectó una banda inespecífica (marcada por una punta de flecha).

2.10.2.- Observación de la escisión de Tmem27 por células beta pancreáticas y células tubulares proximales renales

Una vez identificada la banda que corresponde a la parte de Tmem27 que queda anclada tras la escisión, procedimos a infectar células INS-1 832/13 (control), islotes y células primarias de túbulo proximal de riñón, para observar el patrón de bandas de Tmem27 (Fig. 60); observando en todos los casos la presencia de las bandas con peso molecular inferior a los 25 kDa que indicarían que Tmem27 se ha escindido.

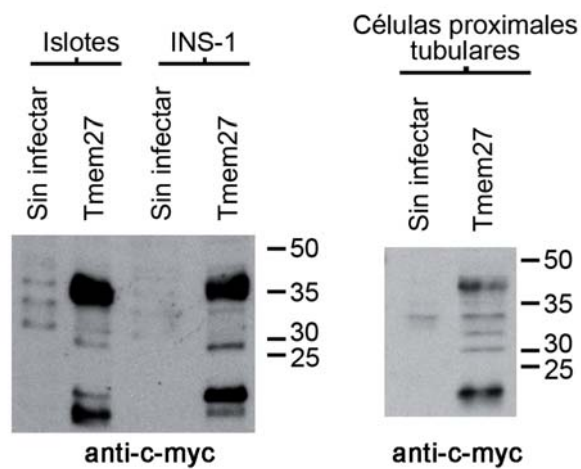


Fig. 60. La rotura de Tmem27 no es exclusiva de células beta, observación de los extractos celulares. Células INS-1 832/13, islotes y células primarias tubulares proximales fueron infectadas con el Ad-Tmem27 y sus extractos proteicos fueron inmunodetectados con el anticuerpo c-myc. Se incluyeron también extractos proteicos de células sin infectar para validar la especificidad de las bandas (control negativo). Obsérvese que las células infectadas presentan bandas por debajo de los 25 kDa.

Por último, para reconfirmar esta observación, se inmunodetectó Tmem27 en el sobrenadante de células INS-1 832/13 y de células primarias tubulares proximales (Fig. 61), detectándose en todos los casos el fragmento de Tmem27 liberado por las células de forma endógena. Para asegurarnos que la banda que observábamos en el sobrenadante era Tmem27, se incluyeron en los Western Blots células infectadas con Ad-Tmem27, de forma que las bandas detectadas en las células infectadas debían ser las mismas que en las células no infectadas pero presentando una mayor intensidad.

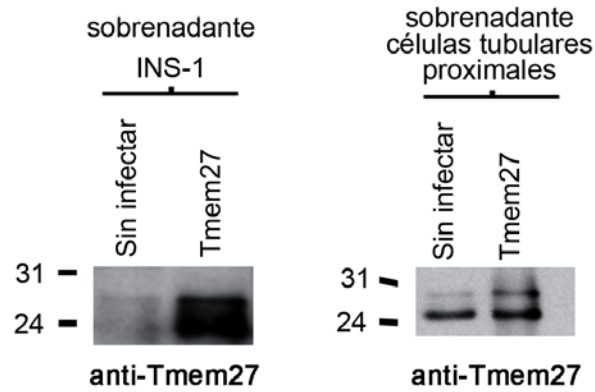


Fig. 61. La rotura de Tmem27 no es exclusiva de células beta, observación del sobrenadante. Inmunodetección de Tmem27 en el sobrenadante de las células INS-1 832/13 y de células proximales tubulares, infectadas y no infectadas con Ad-Tmem27. Las células infectadas se incluyeron para validar la especificidad de las bandas.

Además, se procedió a desglicosilar la banda detectada en el sobrenadante de las células INS-1 832/13, observándose que disminuía su tamaño, hecho que debía pasar si era Tmem27 (Fig. 62). Por todo ello, concluimos que la banda que estábamos detectando en el sobrenadante de estas células era Tmem27, con lo que su escisión no era exclusiva de las células beta y la posibilidad de usarla como un marcador de masa de células beta era casi nula.

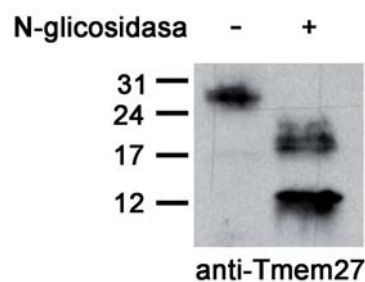


Fig. 62. El fragmento de Tmem27 liberado al sobrenadante se desglicosila. Sobrenadante de células INS-1 832/13 tratadas y no tratadas con N-glicosidasa F e inmunodetectadas con anti-Tmem27.



Aneto

3404 m

DISCUSIÓN

1.- MECANISMOS DE REGENERACIÓN PANCREÁTICA POR LOS CUALES ACTÚA EL TUNGSTATO DE SODIO EN LAS RATAS DIABÉTICAS

La primera parte de los resultados muestra como se modula la plasticidad pancreática a través del tratamiento con tungstato de sodio.

Los animales diabéticos sin tratar presentan hiperglucemia, hipoinsulinemia e hipoamilasemia. Respecto la amilasemia, es necesario esclarecer que aunque a los animales que se les induce diabetes se les administra un tóxico específico de célula beta, los procesos de necrosis que ello conlleva junto con la fuerte hiperglucemia del animal provocan que el páncreas exocrino también se vea alterado [150]. El tratamiento con tungstato en los animales diabéticos da lugar a una reducción de su hiperglucemia, junto con una recuperación parcial de su insulinemia y amilasemia. A nivel morfológico, se observó que los animales diabéticos tratados presentaron un incremento del porcentaje de células beta, acompañado por un incremento en la proliferación y una disminución de la apoptosis de las células beta, junto con un incremento en el porcentaje de células beta y Pdx-1 positivas en los islotes. Cabe comentar que aunque parezca que el porcentaje de recuperación de células beta en el páncreas total de los animales diabéticos tratados sea pequeño (es cuatro veces superior al presentado por los animales diabéticos no tratados, pero casi nueve veces inferior a los animales sanos), éste es un incremento importante debido a:

- a) Estudios realizados por el grupo del Dr. Melton [42] afirman que las células beta se forman principalmente por replicación de las propias células beta preexistentes.
- b) La población de de células beta que permanece remanente en los animales tratados con estreptozotocina es 35 veces inferior la observada en un animal no diabético.
- c) La capacidad de regeneración del páncreas adulto es limitada [37].

Respecto a los animales no diabéticos tratados con tungstato de sodio, éstos presentaron una disminución de su insulinemia (posiblemente por un incremento de su sensibilidad a la insulina y tolerancia a la glucosa), junto con un incremento en la replicación de la célula beta y sin variaciones en el resto de los parámetros. Cabe

señalar que el resultado final del porcentaje de células beta en el páncreas es el resultado del balance entre los procesos de muerte celular (apoptosis y necrosis) y de regeneración (proliferación, transdiferenciación y neogénesis). Por ello, seguramente en el caso de los animales sanos tratados el aumento de proliferación no sea lo suficientemente elevado como para detectar un incremento significativo del porcentaje de células insulina positivas, mientras que en el caso de los animales diabéticos, el aumento en la proliferación junto con la disminución de la apoptosis, permitirían dar un balance positivo y detectar un incremento significativo en el porcentaje de células insulina positivas.

Ante la observación de estos efectos, decidimos analizar los cambios a nivel de la expresión génica en el páncreas de estos animales, de forma que pudiéramos conocer las bases de la plasticidad pancreática inducida por el tungstato. Por ello, procedimos a realizar microarrays de expresión génica del páncreas total de los diferentes animales que estábamos estudiando (sanos y diabéticos y a su vez tratados y no tratados con tungstato de sodio). Es preciso comentar que, aunque el estudio morfométrico del páncreas se centró en los islotes y las células beta, se decidió trabajar con muestras de páncreas total por varias razones:

1. Imposibilidad de aislar islotes de ratas diabéticas por digestión con colagenasa y posterior separación con gradientes de diferentes densidades.
2. Dificultad técnica de aislar islotes por disección láser de los animales diabéticos y obtener un RNA de la suficiente calidad para ser hibridado en microarrays.
3. Desconocimiento de si el aumento de la masa de célula beta era debido exclusivamente a cambios en los islotes o participaban también procesos de neogénesis.

Cada microarrays se hibridó con el material proveniente de 3 páncreas individuales del mismo grupo, de forma que se realizaron agrupaciones (*pools*). La utilización de *pools* tiene sus ventajas e inconvenientes y hay una gran discusión en la bibliografía al respecto [151]. La realización de *pools* tiene como mayor inconveniente que se pierde la información individual, de forma que si introducimos sin darnos cuenta algún elemento que tiene un comportamiento anómalo (*outlier*), no lo podremos detectar y

eliminar. Como ventajas tiene el hecho que mejora la inferencia y que cuanto mayor sea el grupo de individuos que entra en un *pool*, menor es el impacto que tienen los *outliers* y mejor es la inferencia.

A través del estudio con microarrays, obtuvimos un listado de genes diferencialmente expresados, cuya expresión nos permitía diferenciar claramente los animales diabéticos de los animales sanos y dentro de los animales diabéticos, entre los animales tratados y los no tratados. Sorprendentemente los animales sanos tratados y no tratados no podían diferenciarse con esta selección de genes y su grado de expresión. Teniendo en cuenta que fenotípicamente observamos diferencias entre los animales sanos tratados y no tratados y por otra parte, a través del uso de la PCR a tiempo real pudimos detectar cambios de expresión en los islotes de ambos grupos de animales, concluimos que los cambios que se producen en los animales sanos tratados son menores que los observados en los animales diabéticos y que no los podemos detectar de forma significativa a través de microarrays de páncreas total.

Entre los genes considerados como diferencialmente expresados en los animales diabéticos no tratados encontramos genes relacionados con el metabolismo, ciclo celular, estructurales, etc., lo que significa que en el estado diabético se están produciendo alteraciones sobre muchos niveles diferentes. Algo similar sucede en el caso de los genes considerados como diferencialmente expresados en los animales diabéticos tratados, ya que se encuentran modificados genes que participan en procesos de metabolismo, transporte, estructurales, etc. Además, alrededor del 68% de estos genes son variaciones que suponen una normalización parcial de los genes alterados en el caso de la diabetes, con lo que en gran parte el tungstato está normalizando la alteración que se produce en el páncreas del animal diabético.

Cabe comentar que el hecho de haber realizado microarrays de páncreas total nos impide conocer el lugar exacto donde se producen los cambios (tejido endocrino, exocrino o ductos), pero su modulación parecería contribuir a la regeneración global observada. Por otro lado, tal como se ha expuesto en el apartado de la introducción, el tungstato de sodio también es capaz de modificar el estado de fosforilación de varias proteínas (hecho que no podemos controlar en los microarrays), pero que al observar los genes modificados por el tratamiento, observamos que algunos de ellos

(como *Rkip*) actúan a través de la modulación del grado de fosforilación de sus proteínas diana. Así, los cambios observados serían una combinación de efectos debidos a cambios en la expresión génica y a la regulación del estado de fosforilación de ciertas proteínas.

Entre los genes diferencialmente expresados en los animales diabéticos tratados con tungstato de sodio, escogimos siete genes que pudieran explicar en parte el fenotipo observado (Fig.63). Entre ellos se encuentra *Xbp-1*, que explicaría la recuperación del páncreas exocrino observado en los animales diabéticos tratados. Este gen juega un papel fundamental en procesos de UPR (Unfolding protein response, respuesta a proteínas mal plegadas) y cuyo animal genoanulado total (excepto en el hígado para evitar su letalidad embrionaria), presenta problemas en los órganos con características secretoras (páncreas exocrino y glándulas salivares), provocando su letalidad postnatal [143]. Así, hemos observado que en los animales diabéticos, la expresión de *Xbp-1* cae junto con la amilasemia, mientras que con el tratamiento, la expresión de *Xbp-1* se recupera al igual que sucede con la amilasemia.

Respecto a la recuperación del páncreas endocrino, cabe destacar el gen *Rkip*. Éste se localiza (dentro del páncreas) de forma exclusiva en los islotes y una disminución de su expresión da lugar a un incremento en la proliferación de las células beta [122]. *Rkip* actúa inhibiendo la activación de Mek y posteriormente Erk (ambas pertenecientes a la vía de las MAPK), con lo que una disminución de su expresión da lugar a un incremento en la activación (por fosforilación) de Mek y Erk. En el caso de los animales diabéticos no tratados, la expresión de *Rkip* se haya incrementada, con lo que la vía de las MAPK y los estímulos de proliferación por esta vía se encuentran bloqueados. En el caso de los animales diabéticos tratados, los niveles de *Rkip* se encuentran disminuidos, de forma que la vía de las MAPK se haya desbloqueada y la proliferación de los islotes estimulada. Por otro lado, un estudio previo ha demostrado que en el hígado de los animales diabéticos tratados con tungstato de sodio se produce igualmente un incremento en los niveles de activación de la proteína Erk [73], lo que vendría a resaltar la importancia de esta vía en el efecto beneficioso del tungstato de sodio.

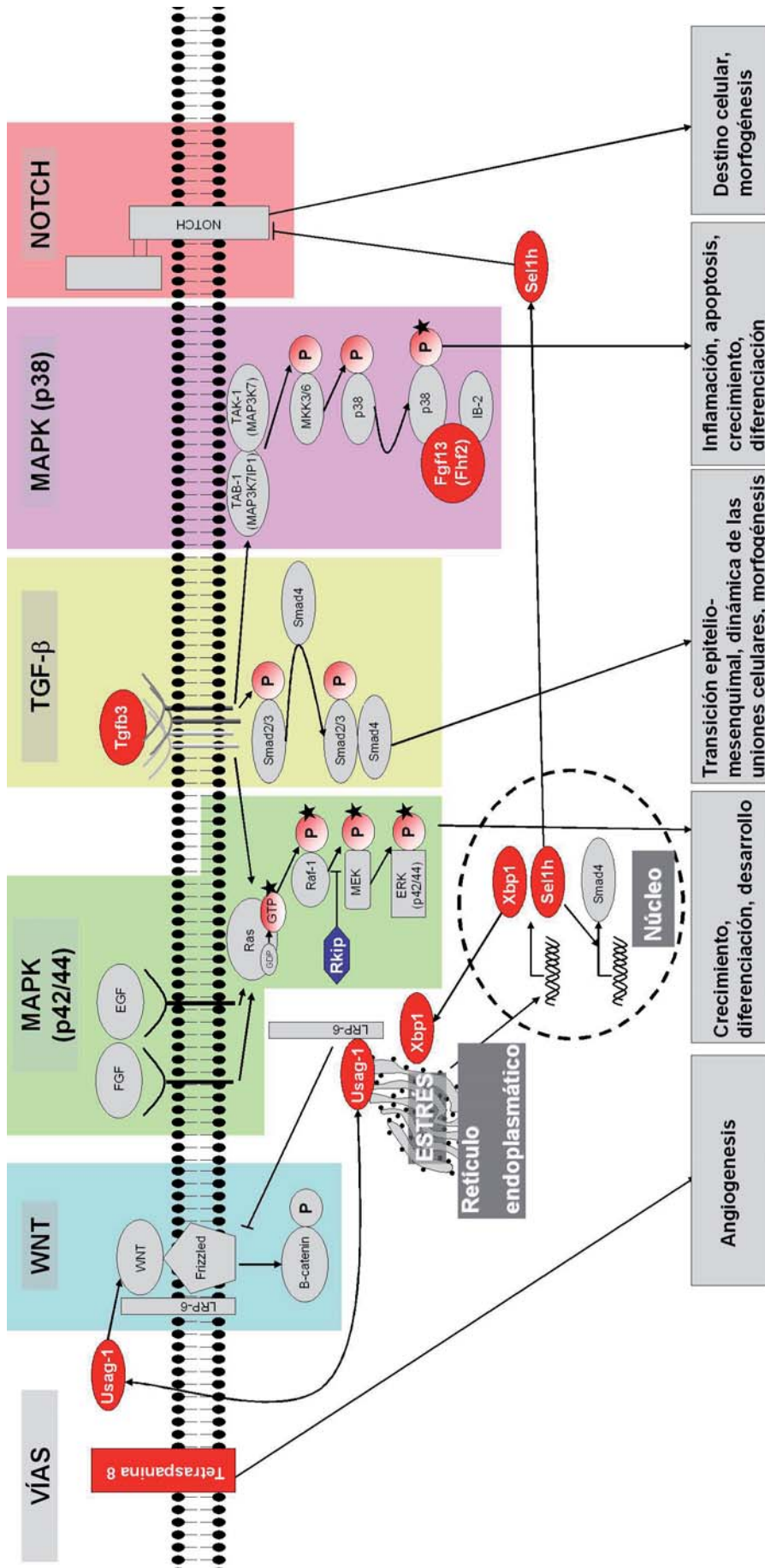


Fig. 63. Vías que intervienen en los efectos del tungstato de sodio sobre el páncreas diabético. El estudio por microarrays de las ratas diabéticas tratadas con tungstato muestra que éste actúa sobre varias vías interconectadas, que conducen a una mejoría global del páncreas. Los genes diferencialmente expresados en los animales diabéticos tratados pueden estar sobreexpresados (en rojo) o silenciados (azul) y pueden activar (↓) o reprimir (⊥) un vía. Los efectos finales de la activación o inhibición de estas vías se describen en la parte inferior de la figura. Las fosforilaciones que pueden modular la vía están representadas a través de un círculo con una P en su interior. Cuando se ha descrito que el tratamiento con tungstato es capaz de aumentar alguna de las fosforilaciones, se representa con una P acompañada de una estrella negra [2-4].

Otro de los genes a destacar es *Fgf13*, el cual se une a *Ib-2* (Islet-brain 2, islote-cerebro 2) y recluta a p38 δ , aumentando la actividad de esta quinasa [123]. Cabe comentar que en los islotes de las ratas nSTZ [2] y en células MIN6 [4], el tratamiento con tungstato de sodio da lugar a un incremento en la fosforilación y activación de p38. Estos datos apuntarían a que la activación de p38 estaría jugando un papel importante en los procesos de plasticidad pancreática inducidos por el tratamiento con tungstato. Otro de los genes interesantes es Tetraspanina 8, cuya capacidad de inducción de la angiogénesis ha sido descrita [125]. Teniendo en cuenta que la estreptozotocina causa daños severos en la microcirculación en los islotes [124] y en el tejido exocrino, el incremento de Tetraspanina 8 podría significar una mejora en la revascularización pancreática y una mejora en la funcionalidad. Por último, otros genes a destacar serían *Tgf- β 3*, *Usag-1* y *Sel1h*. *Tgf- β 3* tiene un destacado rol en procesos de transición epitelio-mesénquima [135], cuya importancia en la regeneración pancreática ha sido establecida [140, 141]. *Usag-1* es capaz de modular la vía Wnt y BMP [129, 152, 153] y *Sel1h* inhibe la vía Notch. *Sel1h* ha sido descrito como un modulador de la proliferación del tejido exocrino [148] y endocrino [145], modificando la expresión de genes involucrados en interacciones matriz extracelular – célula y ciclo celular [154]. El papel exacto que juega cada gen en los procesos de regeneración pancreática observados es desconocido, pero nuestras observaciones llevan a sugerir que la acción combinada de estos genes da lugar a la mejoría observada en las ratas diabéticas tratadas con tungstato.

Debido a la posibilidad que estos cambios en la expresión génica fuesen una consecuencia de la disminución en la hiperglucemia de los animales diabéticos, se determinó la expresión de estos genes en otro modelo de disminución de hiperglucemia: ratas diabéticas tratadas con floricina. La floricina es un compuesto extraído originalmente del manzano que inhibe la reabsorción activa de glucosa en el túbulo renal, hecho que permite la eliminación de glucosa por la orina. Se escogió este método de disminución de la glucemia, frente a otros como sería la administración de insulina, por el hecho que no altera de ninguna manera el páncreas ni es una molécula que active ninguna cascada de señalización (a diferencia de la insulina). Al no observarse variaciones en la mayoría de estos genes en este modelo, se concluyó que los cambios observados eran independientes de la hiperglucemia de los animales.

A partir de ese momento, quisimos profundizar en el mecanismo por el cual se producía un incremento en la proliferación de la célula beta en los animales tratados con tungstato de sodio. Teniendo en cuenta por un lado que uno de los genes modificados por el tratamiento era *Rkip*, cuya implicación en la replicación de las células beta ya había sido descrito a través de la modulación de la vía de las MAPK [122] y que por otro lado, se había descrito que el tungstato era capaz de incrementar la fosforilación de Mek y Erk en hepatocitos [3], centramos nuestros esfuerzos en la vía de las MAPK. Así, observamos que el tratamiento con tungstato de sodio era capaz de incrementar ligeramente los niveles de activación (por fosforilación) de Erk y la proliferación de las células INS-1-E. De todas formas, este incremento era muy pequeño y no justificaba el incremento de masa observado en los animales tratados con tungstato. Por esta razón, nos planteamos si los efectos observados en los animales tratados con tungstato podrían ser debidos a un efecto indirecto del tratamiento, por un metabolito del propio tungstato o por una modificación del perfil proteico de la sangre de los animales. Para esclarecer esta pregunta, cultivamos estas células con suero de los diferentes animales, observando que el suero proveniente de los animales tratados con tungstato daba lugar a un mayor incremento de la activación de Erk y a una mayor proliferación. Fenómeno que se bloqueaba parcialmente al tratar las células con un inhibidor de la vía. Por todo ello concluimos que la regeneración del páncreas por el tratamiento con tungstato era inducida por un metabolito del tungstato o una modificación del perfil sérico, donde la vía de las MAPK estaba jugando un papel central a corto (incremento de la fosforilación directa) y largo término (disminución de la expresión pancreática de *Rkip*).

2.- PAPEL DE TMEM27 EN EL PÁNCREAS ENDOCRINO Y USO POTENCIAL COMO MARCADOR DE MASA DE CÉLULAS BETA

Tal como hemos comentado en el apartado de introducción, el seguimiento de la masa de célula beta a través de la utilización de biomarcadores permitiría mejorar el tratamiento y diagnóstico de la diabetes. Teniendo en cuenta que la proteína *Tmem27* había sido descrita como una proteína relacionada con la proliferación de la célula beta pancreática y cuya parte extracelular había sido propuesta como un posible biomarcador de masa de célula beta [54], quisimos comprobar su utilidad como marcador de proliferación y masa de célula beta en nuestro modelo animal de regeneración pancreática. Por ello, determinamos la expresión de *Tmem27* en los islotes de los animales no diabéticos tratados con tungstato de sodio, los cuales presentaban un incremento en la proliferación de las células beta, observando que, contrariamente a lo que era de esperar, la expresión de *Tmem27* se encontraba disminuida en comparación con los islotes de los animales no tratados. Considerando que también se había descrito la participación de *Tmem27* en procesos de secreción de insulina [99], quisimos ver si la disminución de este gen en los islotes de los animales tratados con tungstato podría estar relacionada con una disminución de la secreción de insulina. Por ello caracterizamos los animales no diabéticos tratados con tungstato, observando que eran más sensibles a la insulina, más tolerantes a la glucosa y cuyas insulinemias estaban disminuidas, junto con la secreción estática de insulina. De esta forma, teniendo en cuenta que los islotes de los animales no diabéticos tratados con tungstato presentan un incremento en su proliferación, junto con una disminución en la secreción de insulina, la disminución de la expresión de *Tmem27* en estos islotes apuntaría a que *Tmem27* estaría más implicado en procesos de secreción de insulina que en procesos de proliferación.

Cabe resaltar que este modelo animal (ratas sanas tratadas con tungstato) es ideal para el estudio de este gen, debido al comportamiento divergente en cuanto sus niveles de proliferación y su capacidad de secreción de insulina. En la mayoría de los modelos animales, un incremento en la proliferación va acompañado por un incremento en la secreción de insulina y en la expresión de *Tmem27* y la inversa

(ratones *ob/ob*, *db/db*, *aP2-Srebp-1c*, *KKAY*, genoanulado para *HNF-1 α* , etc. [54, 99]). De esta manera, en la mayoría de los modelos animales es difícil diferenciar los efectos debidos a modificaciones en la secreción de insulina de efectos debidos a alteraciones en los niveles de proliferación.

A partir de ese momento, procedimos a profundizar en el papel de *Tmem27* en los islotes y su posible uso como marcador de masa de célula beta.

En primer lugar, recomprobamos que en el páncreas humano la expresión de *TMEM27* se restringía a los islotes y dentro de éstos a las células beta. A continuación, observamos que en situaciones patológicas de diabetes de tipo 2, los islotes expresaban en menor cantidad *TMEM27*, hecho que también fue descrito en un estudio previo en el que a través de un análisis por microarrays, se observaba que uno de los genes que se presentaban disminuidos en islotes de donantes con diabetes de tipo 2 era *TMEM27* [155]. Además, en otro estudio de análisis de expresión génica de islotes de donantes con un diagnóstico reciente de diabetes de tipo 1, se observa que *TMEM27* también se haya disminuido [156]. Todo ello apuntaría a un posible papel de *TMEM27* en la patofisiología de las células beta.

Para profundizar en el papel de *TMEM27* en los islotes humanos, realizamos estudios de expresión génica, observando que *TMEM27* presentaba una correlación positiva y significativa con genes relacionados con la secreción de insulina (*INSULINA* y *ESNAPINA* [la interacción física entre *TMEM27* y *ESNAPINA* ya había sido descrita previamente [99]), mientras que no presentaba una correlación positiva con genes implicados en la progresión del ciclo celular (*CICLINA E1*, *CICLINA D1*, *CDK2* y *CDK6*). Lo cual apuntaba de nuevo a un papel de *TMEM27* en procesos de secreción de insulina, pero no en procesos de proliferación.

Todas las aproximaciones realizadas hasta el momento tan solo podían sugerir de una forma indirecta el papel de *Tmem27*, por ello procedimos a buscar una aproximación directa mediante la sobreexpresión de *Tmem27* en células *INS-1 832/13* e islotes. Antes de proceder a la clonación de *Tmem27*, nos percatamos que los dos artículos que habían descrito el papel de *Tmem27* en los islotes y que habían llegado a conclusiones divergentes, clonaron *Tmem27* de material procedente de humanos [99] o ratones [54]; además, observamos por Western blot un patrón de bandas de *Tmem27* diferente en islotes de rata, ratón y humanos. Por ello nos preguntamos si podrían

existir diferencias entre especies respecto a la función de Tmem27. Por este motivo clonamos Tmem27 de rata, ratón y humanos y lo sobrexpresamos en células INS-1 832/13, observando de nuevo diferencias en los patrones de bandas; de forma que concluimos que las diferencias observadas a nivel de Western blot eran debidas a las diferencias en la secuencia primaria, ya que todas las isoformas habían sido sobrexpresadas en el mismo tipo celular y se continuaban viendo diferencias.

Respecto a su función, la sobrexpresión de las diferentes formas de Tmem27 dio lugar por igual a un incremento en la secreción de insulina inducida por glucosa y a un leve incremento en la proliferación, sin que se observase un incremento significativo en el número total de células. De esta forma, concluimos que no había diferencias a nivel de especie en cuanto a la funcionalidad de Tmem27. Para acabar de definir la funcionalidad de Tmem27, y teniendo en cuenta que las líneas celulares a veces presentan características aberrantes, se sobrexpresó Tmem27 en cultivos primarios de islotes. En este modelo se observó que la sobrexpresión de Tmem27 daba lugar a un incremento en la secreción de insulina inducida por glucosa sin que se vieses alterados los niveles de proliferación. De esta manera, concluimos que los resultados obtenidos apuntan hacia una función de Tmem27 en la secreción de insulina con poca o ninguna contribución a la replicación de la célula beta.

Por último, teniendo en cuenta que la parte extracelular de Tmem27 había sido propuesta como un posible marcador de masa de célula beta [54], quisimos profundizar en este tema y ver si realmente podía ser utilizado como biomarcador. Según Akpinar y colaboradores [54], Tmem27 es una proteína situada en la membrana citoplasmática, que se escinde exclusivamente en las células beta de forma constitutiva e independiente de la glucemia. La medición de la parte liberada permitiría tener una medida indirecta de la masa de célula beta remanente del individuo estudiado.

Nuestros estudios confirman que Tmem27 es escindido en las células beta y su parte extracelular liberada, pero también demuestran que esta proteína también es escindida por las células renales proximales tubulares. Este resultado entra en clara contradicción con los resultados publicados por Akpinar y colaboradores [54], pero una posible explicación es que ellos hayan utilizado una línea celular inmortalizada de células epiteliales de riñón (HEK, human epithelial kidney), mientras que en nuestros

estudios hemos empleado un cultivo primario de células renales proximales tubulares. Es decir, nosotros hemos empleado un cultivo primario (con menos aberraciones que un cultivo inmortalizado) de células del lugar exacto donde se expresa Tmem27. De esta forma, hemos demostrado que la presencia de Tmem27 en sangre puede tener dos orígenes, el riñón y el páncreas, lo que imposibilita el uso de Tmem27 como biomarcador de masa de célula beta, ya que cuando las cantidades circulantes de esta proteína se vean alterados, no se sabrá si esta alteración tiene como origen un problema en el páncreas o en el riñón.



Gran Paraiso

4061 m

CONCLUSIONES

1.- MECANISMOS DE REGENERACIÓN PANCREÁTICA POR LOS CUALES ACTÚA EL TUNGSTATO DE SODIO EN LAS RATAS DIABÉTICAS

- 1.1. El tratamiento con tungstato de sodio es capaz de mejorar el fenotipo y la morfología pancreática de las ratas diabéticas.
- 1.2. Las mejorías observadas en los animales diabéticos son el resultado de la modificación en la expresión génica de genes implicados en diferentes vías, tales como Wnt, TGF- β , Notch y MAPK.
- 1.3. Estas modificaciones son independientes de la glucemia de los animales.
- 1.4. La vía de las MAPK juega un papel clave en el aumento de la replicación de las células beta inducido por el tratamiento con tungstato.
- 1.5. El tratamiento está ejerciendo sus efectos sobre la replicación de la célula beta a través de un metabolito suyo o a través de la modificación del perfil sérico de los animales tratados.

2.- PAPEL DE TMEM27 EN EL PÁNCREAS ENDOCRINO Y USO POTENCIAL COMO MARCADOR DE MASA DE CÉLULAS BETA

- 2.1. La localización de Tmem27 se restringe a las células beta pancreáticas y a las células proximales tubulares renales.
- 2.2. Los resultados obtenidos en el modelo animal de rata tratada con tungstato, estudios de expresión génica en islotes humanos de donantes sanos y diabéticos y estudios de sobreexpresión de Tmem27 en líneas celulares e islotes, apuntan a un papel de esta proteína en la secreción de insulina con poca o ninguna contribución en la replicación de la célula beta.
- 2.3. La escisión y liberación al espacio celular de Tmem27 por células beta pancreáticas y célula tubulares proximales renales, imposibilita su uso como biomarcador de masa de célula beta.



Noufonts

2861 m

BIBLIOGRAFÍA

- [1] (2009) Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 32 Suppl 1: S62-67
- [2] Fernandez-Alvarez J, Barbera A, Nadal B, et al. (2004) Stable and functional regeneration of pancreatic beta-cell population in nSTZ-rats treated with tungstate. *Diabetologia* 47: 470-477
- [3] Dominguez JE, Munoz MC, Zafra D, et al. (2003) The antidiabetic agent sodium tungstate activates glycogen synthesis through an insulin receptor-independent pathway. *J Biol Chem* 278: 42785-42794
- [4] Piquer S, Barcelo-Batllori S, Julia M, et al. (2007) Phosphorylation events implicating p38 and PI3K mediate tungstate-effects in MIN6 beta cells. *Biochem Biophys Res Commun* 358: 385-391
- [5] International Diabetes Federation (2003) *Diabetes atlas*, Brussels, Belgium
- [6] DeFronzo R, Ferrannini E, Keen H, Zimmet P (2004) *International textbook of Diabetes Mellitus*. Jhon Wiley and Sons, Ltd, Chichester, England
- [7] Khan C, Weir G, GL K, AM J, AC M, RJ S (2005) *Joslin's diabetes mellitus*. Lippincot Williams & Wilkins, Boston, USA
- [8] von Mering J, Minkowski O (1889) Diabetes mellitus nach pankreas-extirpation. *Ach Exp Pathol Phamacol* 26: 371-387
- [9] Saito K, Iwama N, Takahashi T (1978) Morphometrical analysis on topographical difference in size distribution, number and volume of islets in the human pancreas. *Tohoku J Exp Med* 124: 177-186
- [10] Ku SK, Lee HS, Lee JH (2002) Immunohistochemical study of the pancreatic endocrine cells in the BALB/c mice: an unique distributional pattern of glucagon. *J Vet Sci* 3: 167-173
- [11] Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren PO, Caicedo A (2006) The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 2334-2339
- [12] Malaisse-Lagae F, Stefan Y, Cox J, Perrelet A, Orci L (1979) Identification of a lobe in the adult human pancreas rich in pancreatic polypeptide. *Diabetologia* 17: 361-365
- [13] Messier B, Leblond CP (1960) Cell proliferation and migration as revealed by radioautography after injection of thymidine-H3 into male rats and mice. *Am J Anat* 106: 247-285
- [14] Tsubouchi S, Kano E, Suzuki H (1987) Demonstration of expanding cell populations in mouse pancreatic acini and islets. *Anat Rec* 218: 111-115
- [15] Bonner-Weir S, Baxter LA, Schuppin GT, Smith FE (1993) A second pathway for regeneration of adult exocrine and endocrine pancreas. A possible recapitulation of embryonic development. *Diabetes* 42: 1715-1720
- [16] Bonner-Weir S, Sharma A (2002) Pancreatic stem cells. *J Pathol* 197: 519-526
- [17] Zajicek G, Arber N, Schwartz-Arad D, Ariel I (1990) Streaming pancreas: islet cell kinetics. *Diabetes Res* 13: 121-125
- [18] Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ, et al. (2001) Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes* 50: 521-533
- [19] Ianus A, Holz GG, Theise ND, Hussain MA (2003) In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Clin Invest* 111: 843-850

- [20] Minami K, Okuno M, Miyawaki K, et al. (2005) Lineage tracing and characterization of insulin-secreting cells generated from adult pancreatic acinar cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 15116-15121
- [21] Guz Y, Nasir I, Teitelman G (2001) Regeneration of pancreatic beta cells from intra-islet precursor cells in an experimental model of diabetes. *Endocrinology* 142: 4956-4968
- [22] Rhodes CJ (2005) Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death? *Science* 307: 380-384
- [23] Kaung HL (1994) Growth dynamics of pancreatic islet cell populations during fetal and neonatal development of the rat. *Dev Dyn* 200: 163-175
- [24] Bertin E, Gangnerau MN, Bellon G, Bailbe D, Arbelot De Vacqueur A, Portha B (2002) Development of beta-cell mass in fetuses of rats deprived of protein and/or energy in last trimester of pregnancy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283: R623-630
- [25] Scaglia L, Cahill CJ, Finegood DT, Bonner-Weir S (1997) Apoptosis participates in the remodeling of the endocrine pancreas in the neonatal rat. *Endocrinology* 138: 1736-1741
- [26] Meier JJ, Butler AE, Saisho Y, et al. (2008) Beta-cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of beta-cell mass in humans. *Diabetes* 57: 1584-1594
- [27] Kassem SA, Ariel I, Thornton PS, Scheimberg I, Glaser B (2000) Beta-cell proliferation and apoptosis in the developing normal human pancreas and in hyperinsulinism of infancy. *Diabetes* 49: 1325-1333
- [28] Finegood DT, Scaglia L, Bonner-Weir S (1995) Dynamics of beta-cell mass in the growing rat pancreas. Estimation with a simple mathematical model. *Diabetes* 44: 249-256
- [29] Teta M, Long SY, Wartschow LM, Rankin MM, Kushner JA (2005) Very slow turnover of beta-cells in aged adult mice. *Diabetes* 54: 2557-2567
- [30] Sorenson RL, Brelje TC (1997) Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: beta-cell growth, enhanced insulin secretion and the role of lactogenic hormones. *Horm Metab Res* 29: 301-307
- [31] Bonner-Weir S (2000) Perspective: Postnatal pancreatic beta cell growth. *Endocrinology* 141: 1926-1929
- [32] Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC (2003) Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52: 102-110
- [33] Butler AE, Janson J, Soeller WC, Butler PC (2003) Increased beta-cell apoptosis prevents adaptive increase in beta-cell mass in mouse model of type 2 diabetes: evidence for role of islet amyloid formation rather than direct action of amyloid. *Diabetes* 52: 2304-2314
- [34] Hayashi KY, Tamaki H, Handa K, Takahashi T, Kakita A, Yamashina S (2003) Differentiation and proliferation of endocrine cells in the regenerating rat pancreas after 90% pancreatectomy. *Arch Histol Cytol* 66: 163-174
- [35] Rosenberg L, Brown RA, Duguid WP (1983) A new approach to the induction of duct epithelial hyperplasia and nesidioblastosis by cellophane wrapping of the hamster pancreas. *J Surg Res* 35: 63-72

- [36] Wang RN, Kloppel G, Bouwens L (1995) Duct- to islet-cell differentiation and islet growth in the pancreas of duct-ligated adult rats. *Diabetologia* 38: 1405-1411
- [37] Dutrillaux MC, Portha B, Roze C, Hollande E (1982) Ultrastructural study of pancreatic B cell regeneration in newborn rats after destruction by streptozotocin. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 39: 173-185
- [38] Johnson DD (1950) Alloxan administration in the guinea pig; a study of the regenerative phase in the islands of Langerhans. *Endocrinology* 47: 393-398
- [39] Kletzin A, Adams MW (1996) Tungsten in biological systems. *FEMS Microbiol Rev* 18: 5-63
- [40] Gu D, Sarvetnick N (1993) Epithelial cell proliferation and islet neogenesis in IFN-g transgenic mice. *Development* 118: 33-46
- [41] Rankin MM, Kushner JA (2009) Adaptive beta-cell proliferation is severely restricted with advanced age. *Diabetes* 58: 1365-1372
- [42] Dor Y, Brown J, Martinez OI, Melton DA (2004) Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 429: 41-46
- [43] Long MA, Rossi FM (2009) Silencing inhibits Cre-mediated recombination of the Z/AP and Z/EG reporters in adult cells. *PLoS One* 4: e5435
- [44] Brennand K, Huangfu D, Melton D (2007) All beta cells contribute equally to islet growth and maintenance. *PLoS Biol* 5: e163
- [45] Bonner-Weir S, Sharma A (2006) Are there pancreatic progenitor cells from which new islets form after birth? *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2: 240-241
- [46] Xu X, D'Hoker J, Stange G, et al. (2008) Beta cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas. *Cell* 132: 197-207
- [47] Lee CS, De Leon DD, Kaestner KH, Stoffers DA (2006) Regeneration of pancreatic islets after partial pancreatectomy in mice does not involve the reactivation of neurogenin-3. *Diabetes* 55: 269-272
- [48] Teta M, Rankin MM, Long SY, Stein GM, Kushner JA (2007) Growth and regeneration of adult beta cells does not involve specialized progenitors. *Dev Cell* 12: 817-826
- [49] Inada A, Nienaber C, Katsuta H, et al. (2008) Carbonic anhydrase II-positive pancreatic cells are progenitors for both endocrine and exocrine pancreas after birth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 19915-19919
- [50] Gradwohl G, Dierich A, LeMeur M, Guillemot F (2000) neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 1607-1611
- [51] Saudek F, Brogren CH, Manohar S (2008) Imaging the Beta-cell mass: why and how. *Rev Diabet Stud* 5: 6-12
- [52] Freeby M, Goland R, Ichise M, Maffei A, Leibel R, Harris P (2008) VMAT2 quantitation by PET as a biomarker for beta-cell mass in health and disease. *Diabetes Obes Metab* 10 Suppl 4: 98-108
- [53] Paty BW, Bonner-Weir S, Laughlin MR, McEwan AJ, Shapiro AM (2004) Toward development of imaging modalities for islets after transplantation: insights from the National Institutes of Health Workshop on Beta Cell Imaging. *Transplantation* 77: 1133-1137
- [54] Akpınar P, Kuwajima S, Krutzfeldt J, Stoffel M (2005) Tmem27: a cleaved and shed plasma membrane protein that stimulates pancreatic beta cell proliferation. *Cell Metab* 2: 385-397

- [55] Rorsman P, Renstrom E (2003) Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 46: 1029-1045
- [56] Colaboradores de Wikipedia (2009) Wolframio, Wikipedia, La enciclopedia libre. In:
- [57] Stankiewicz PJ, Gresser MJ (1988) Inhibition of phosphatase and sulfatase by transition-state analogues. *Biochemistry* 27: 206-212
- [58] Stuckey JA, Schubert HL, Fauman EB, Zhang ZY, Dixon JE, Saper MA (1994) Crystal structure of Yersinia protein tyrosine phosphatase at 2.5 Å and the complex with tungstate. *Nature* 370: 571-575
- [59] Foster JD, Young SE, Brandt TD, Nordlie RC (1998) Tungstate: a potent inhibitor of multifunctional glucose-6-phosphatase. *Arch Biochem Biophys* 354: 125-132
- [60] Makde RD, Mahajan SK, Kumar V (2007) Structure and mutational analysis of the PhoN protein of *Salmonella typhimurium* provide insight into mechanistic details. *Biochemistry* 46: 2079-2090
- [61] Hamada K, Kato M, Shimizu T, Ihara K, Mizuno T, Hakoshima T (2005) Crystal structure of the protein histidine phosphatase SixA in the multistep His-Asp phosphorelay. *Genes Cells* 10: 1-11
- [62] Heyliger CE, Tahiliani AG, McNeill JH (1985) Effect of vanadate on elevated blood glucose and depressed cardiac performance of diabetic rats. *Science* 227: 1474-1477
- [63] Bendayan M, Gingras D (1989) Effect of vanadate administration on blood glucose and insulin levels as well as on the exocrine pancreatic function in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* 32: 561-567
- [64] Meyerovitch J, Farfel Z, Sack J, Shechter Y (1987) Oral administration of vanadate normalizes blood glucose levels in streptozotocin-treated rats. Characterization and mode of action. *J Biol Chem* 262: 6658-6662
- [65] Schulz LO (1988) Suppression of the hepatic glucose-6-phosphatase system in diabetic rats by vanadate. *Ann Nutr Metab* 32: 289-296
- [66] Bollen M, Miralpeix M, Ventura F, Toth B, Bartrons R, Stalmans W (1990) Oral administration of vanadate to streptozotocin-diabetic rats restores the glucose-induced activation of liver glycogen synthase. *Biochem J* 267: 269-271
- [67] Gil J, Miralpeix M, Carreras J, Bartrons R (1988) Insulin-like effects of vanadate on glucokinase activity and fructose 2,6-bisphosphate levels in the liver of diabetic rats. *J Biol Chem* 263: 1868-1871
- [68] Fillat C, Rodriguez-Gil JE, Guinovart JJ (1992) Molybdate and tungstate act like vanadate on glucose metabolism in isolated hepatocytes. *Biochem J* 282 (Pt 3): 659-663
- [69] Barbera A, Rodriguez-Gil JE, Guinovart JJ (1994) Insulin-like actions of tungstate in diabetic rats. Normalization of hepatic glucose metabolism. *J Biol Chem* 269: 20047-20053
- [70] Munoz MC, Barbera A, Dominguez J, Fernandez-Alvarez J, Gomis R, Guinovart JJ (2001) Effects of tungstate, a new potential oral antidiabetic agent, in Zucker diabetic fatty rats. *Diabetes* 50: 131-138
- [71] Puck TT, Cieciura SJ, Robinson A (1958) Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J Exp Med* 108: 945-956

- [72] Reynet C, Caron M, Magre J, et al. (1990) Mutation of tyrosine residues 1162 and 1163 of the insulin receptor affects hormone and receptor internalization. *Mol Endocrinol* 4: 304-311
- [73] Zafra D (2006) Mecanismo de acción a nivel molecular del tungstato de sodio, un agente antidiabético. In: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Barcelona, Barcelona
- [74] Barbera A, Fernandez-Alvarez J, Truc A, Gomis R, Guinovart JJ (1997) Effects of tungstate in neonatally streptozotocin-induced diabetic rats: mechanism leading to normalization of glycaemia. *Diabetologia* 40: 143-149
- [75] Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, Edlund H (1994) Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 371: 606-609
- [76] McKinnon CM, Docherty K (2001) Pancreatic duodenal homeobox-1, PDX-1, a major regulator of beta cell identity and function. *Diabetologia* 44: 1203-1214
- [77] Rodriguez-Gallardo J, Silvestre RA, Egido EM, Marco J (2000) Effects of sodium tungstate on insulin and glucagon secretion in the perfused rat pancreas. *Eur J Pharmacol* 402: 199-204
- [78] Young A (2005) Inhibition of insulin secretion. *Adv Pharmacol* 52: 173-192
- [79] Silvestre RA, Egido EM, Hernandez R, Marco J (2005) Tungstate stimulates insulin release and inhibits somatostatin output in the perfused rat pancreas. *Eur J Pharmacol* 519: 127-134
- [80] Miyazaki J, Araki K, Yamato E, et al. (1990) Establishment of a pancreatic beta cell line that retains glucose-inducible insulin secretion: special reference to expression of glucose transporter isoforms. *Endocrinology* 127: 126-132
- [81] Goto Y, Kida K, Ikeuchi M, Kaino Y, Matsuda H (1992) Synergism in insulin-like effects of molybdate plus H₂O₂ or tungstate plus H₂O₂ on glucose transport by isolated rat adipocytes. *Biochem Pharmacol* 44: 174-177
- [82] Claret M, Corominola H, Canals I, et al. (2005) Tungstate decreases weight gain and adiposity in obese rats through increased thermogenesis and lipid oxidation. *Endocrinology* 146: 4362-4369
- [83] Barcelo-Batlloiri S, Kalko SG, Esteban Y, Moreno S, Carmona MC, Gomis R (2008) Integration of DIGE and bioinformatics analyses reveals a role of the antiobesity agent tungstate in redox and energy homeostasis pathways in brown adipose tissue. *Mol Cell Proteomics* 7: 378-393
- [84] Canals I, Carmona MC, Amigo M, et al. (2009) A functional leptin system is essential for sodium tungstate antiobesity action. *Endocrinology* 150: 642-650
- [85] Carmona MC, Amigo M, Barcelo-Batlloiri S, et al. (2009) Dual effects of sodium tungstate on adipocyte biology: inhibition of adipogenesis and stimulation of cellular oxygen consumption. *Int J Obes (Lond)* 33: 534-540
- [86] Ballester J, Dominguez J, Munoz MC, et al. (2005) Tungstate treatment improves Leydig cell function in streptozotocin-diabetic rats. *J Androl* 26: 706-715
- [87] Ballester J, Munoz MC, Dominguez J, et al. (2007) Tungstate administration improves the sexual and reproductive function in female rats with streptozotocin-induced diabetes. *Hum Reprod* 22: 2128-2135
- [88] Lemberg A, Fernandez MA, Ouvina G, et al. (2007) Enzymatic activities in brains of diabetic rats treated with vanadyl sulphate and sodium tungstate. *Acta Physiol Hung* 94: 315-319

- [89] Gomez-Ramos A, Dominguez J, Zafra D, et al. (2006) Sodium tungstate decreases the phosphorylation of tau through GSK3 inactivation. *J Neurosci Res* 83: 264-273
- [90] Palanivel R, Sakthisekaran D (2002) Immunomodulatory effect of tungstate on streptozotocin-induced experimental diabetes in rats. *Ann N Y Acad Sci* 958: 382-386
- [91] Al-Awwadi N, Bichon-Laurent F, Dimo T, et al. (2004) Differential effects of sodium tungstate and vanadyl sulfate on vascular responsiveness to vasoactive agents and insulin sensitivity in fructose-fed rats. *Can J Physiol Pharmacol* 82: 911-918
- [92] Nagareddy PR, Vasudevan H, McNeill JH (2005) Oral administration of sodium tungstate improves cardiac performance in streptozotocin-induced diabetic rats. *Can J Physiol Pharmacol* 83: 405-411
- [93] Furnsinn C, Englisch R, Ebner K, Nowotny P, Vogl C, Waldhausl W (1996) Insulin-like vs. non-insulin-like stimulation of glucose metabolism by vanadium, tungsten, and selenium compounds in rat muscle. *Life Sci* 59: 1989-2000
- [94] Giron MD, Sevillano N, Vargas AM, Dominguez J, Guinovart JJ, Salto R (2008) The glucose-lowering agent sodium tungstate increases the levels and translocation of GLUT4 in L6 myotubes through a mechanism associated with ERK1/2 and MEF2D. *Diabetologia* 51: 1285-1295
- [95] Zhang H, Wada J, Hida K, et al. (2001) Collectrin, a collecting duct-specific transmembrane glycoprotein, is a novel homolog of ACE2 and is developmentally regulated in embryonic kidneys. *J Biol Chem* 276: 17132-17139
- [96] Malakauskas SM, Quan H, Fields TA, et al. (2007) Aminoaciduria and altered renal expression of luminal amino acid transporters in mice lacking novel gene collectrin. *Am J Physiol Renal Physiol* 292: F533-544
- [97] Danilczyk U, Sarao R, Remy C, et al. (2006) Essential role for collectrin in renal amino acid transport. *Nature* 444: 1088-1091
- [98] Zhang Y, Wada J, Yasuhara A, et al. (2007) The role for HNF-1beta-targeted collectrin in maintenance of primary cilia and cell polarity in collecting duct cells. *PLoS One* 2: e414
- [99] Fukui K, Yang Q, Cao Y, et al. (2005) The HNF-1 target collectrin controls insulin exocytosis by SNARE complex formation. *Cell Metab* 2: 373-384
- [100] Malakauskas SM, Kourany WM, Zhang XY, et al. (2009) Increased insulin sensitivity in mice lacking collectrin, a downstream target of HNF-1alpha. *Mol Endocrinol* 23: 881-892
- [101] Asfari M, Janjic D, Meda P, Li G, Halban PA, Wollheim CB (1992) Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology* 130: 167-178
- [102] Merglen A, Theander S, Rubi B, Chaffard G, Wollheim CB, Maechler P (2004) Glucose sensitivity and metabolism-secretion coupling studied during two-year continuous culture in INS-1E insulinoma cells. *Endocrinology* 145: 667-678
- [103] Hohmeier HE, Mulder H, Chen G, Henkel-Rieger R, Prentki M, Newgard CB (2000) Isolation of INS-1-derived cell lines with robust ATP-sensitive K⁺ channel-dependent and -independent glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 49: 424-430
- [104] Serino R, Ueta Y, Tokunaga M, et al. (1998) Upregulation of hypothalamic nitric oxide synthase gene expression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia* 41: 640-648

- [105] Kreutz C, Bartolome Rodriguez MM, Maiwald T, et al. (2007) An error model for protein quantification. *Bioinformatics* 23: 2747-2753
- [106] Affymetrix Inc GeneChip® Expression Analysis Data Analysis Fundamentals. Available from https://www.affymetrix.com/support/downloads/manuals/data_analysis_fundamentals_manual.pdf
- [107] Wilson CL, Miller CJ (2005) Simpleaffy: a BioConductor package for Affymetrix Quality Control and data analysis. *Bioinformatics* 21: 3683-3685
- [108] Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, et al. (2004) Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 5: R80
- [109] Ihaka R, Gentleman R (1996) R: A Language for Data Analysis and Graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics* 3: 299-314
- [110] R Development Core Team (2006) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria
- [111] Gautier L, Cope L, Bolstad BM, Irizarry RA (2004) affy--analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics* 20: 307-315
- [112] Bolstad B (2004) Low level analysis of high-density oligonucleotide array data: Background, normalization and summarization. In: University of California, Berkeley
- [113] Li C, Wong WH (2001) Model-based analysis of oligonucleotide arrays: expression index computation and outlier detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 31-36
- [114] Li C, Hung Wong W (2001) Model-based analysis of oligonucleotide arrays: model validation, design issues and standard error application. *Genome Biol* 2: RESEARCH0032
- [115] Affymetrix Inc Statistical Algorithms Description Document. Available from http://www.affymetrix.com/support/technical/whitepapers/sadd_whitepaper.pdf
- [116] Affymetrix Inc Guide to Probe Logarithmic Intensity Error (PLIER) Estimation. Available from http://www.affymetrix.com/support/technical/technotes/plier_technote.pdf
- [117] Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, et al. (2003) Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 4: 249-264
- [118] Smyth GK (2004) Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 3: Article3
- [119] Liu G, Loraine AE, Shigeta R, et al. (2003) NetAffx: Affymetrix probesets and annotations. *Nucleic Acids Res* 31: 82-86
- [120] Ashburner M, Ball CA, Blake JA, et al. (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 25: 25-29
- [121] Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159
- [122] Zhang L, Fu Z, Binkley C, et al. (2004) Raf kinase inhibitory protein inhibits beta-cell proliferation. *Surgery* 136: 708-715
- [123] Schoorlemmer J, Goldfarb M (2002) Fibroblast growth factor homologous factors and the islet brain-2 scaffold protein regulate activation of a stress-activated protein kinase. *J Biol Chem* 277: 49111-49119
- [124] Enghofer M, Usadel KH, Beck O, Kusterer K (1997) Superoxide dismutase reduces islet microvascular injury induced by streptozotocin in the rat. *Am J Physiol* 273: E376-382

- [125] Gesierich S, Berezovskiy I, Ryschich E, Zoller M (2006) Systemic induction of the angiogenesis switch by the tetraspanin D6.1A/CO-029. *Cancer Res* 66: 7083-7094
- [126] Itasaki N, Jones CM, Mercurio S, et al. (2003) Wise, a context-dependent activator and inhibitor of Wnt signalling. *Development* 130: 4295-4305
- [127] Yanagita M (2005) BMP antagonists: their roles in development and involvement in pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 16: 309-317
- [128] Tanaka M, Endo S, Okuda T, et al. (2008) Expression of BMP-7 and USAG-1 (a BMP antagonist) in kidney development and injury. *Kidney Int* 73: 181-191
- [129] Kassai Y, Munne P, Hotta Y, et al. (2005) Regulation of mammalian tooth cusp patterning by ectodin. *Science* 309: 2067-2070
- [130] Beaudoin GM, 3rd, Sisk JM, Coulombe PA, Thompson CC (2005) Hairless triggers reactivation of hair growth by promoting Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 14653-14658
- [131] Rulifson IC, Karnik SK, Heiser PW, et al. (2007) Wnt signaling regulates pancreatic beta cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 6247-6252
- [132] Wells JM, Esni F, Boivin GP, et al. (2007) Wnt/beta-catenin signaling is required for development of the exocrine pancreas. *BMC Dev Biol* 7: 4
- [133] Siveke JT, Lubeseder-Martellato C, Lee M, et al. (2008) Notch signaling is required for exocrine regeneration after acute pancreatitis. *Gastroenterology* 134: 544-555
- [134] Jiang FX, Stanley EG, Gonez LJ, Harrison LC (2002) Bone morphogenetic proteins promote development of fetal pancreas epithelial colonies containing insulin-positive cells. *J Cell Sci* 115: 753-760
- [135] Koo SH, Cunningham MC, Arabshahi B, Gruss JS, Grant JH, 3rd (2001) The transforming growth factor-beta 3 knock-out mouse: an animal model for cleft palate. *Plast Reconstr Surg* 108: 938-948; discussion 949-951
- [136] Muraoka N, Shum L, Fukumoto S, Nomura T, Ohishi M, Nonaka K (2005) Transforming growth factor-beta3 promotes mesenchymal cell proliferation and angiogenesis mediated by the enhancement of cyclin D1, Flk-1, and CD31 gene expression during CL/Fr mouse lip fusion. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 73: 956-965
- [137] Roussa E, Wiehle M, Dunker N, Becker-Katins S, Oehlke O, Kriegstein K (2006) Transforming growth factor beta is required for differentiation of mouse mesencephalic progenitors into dopaminergic neurons in vitro and in vivo: ectopic induction in dorsal mesencephalon. *Stem Cells* 24: 2120-2129
- [138] Lui WY, Lee WM, Cheng CY (2003) Transforming growth factor beta3 regulates the dynamics of Sertoli cell tight junctions via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Biol Reprod* 68: 1597-1612
- [139] Massague J (1998) TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67: 753-791
- [140] Gershengorn MC, Hardikar AA, Wei C, Geras-Raaka E, Marcus-Samuels B, Raaka BM (2004) Epithelial-to-mesenchymal transition generates proliferative human islet precursor cells. *Science* 306: 2261-2264
- [141] Hanley S, Rosenberg L (2007) Transforming growth factor beta is a critical regulator of adult human islet plasticity. *Mol Endocrinol* 21: 1467-1477

- [142] Lee AH, Iwakoshi NN, Glimcher LH (2003) XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol* 23: 7448-7459
- [143] Lee AH, Chu GC, Iwakoshi NN, Glimcher LH (2005) XBP-1 is required for biogenesis of cellular secretory machinery of exocrine glands. *Embo J* 24: 4368-4380
- [144] Cattaneo M, Orlandini S, Beghelli S, et al. (2003) SEL1L expression in pancreatic adenocarcinoma parallels SMAD4 expression and delays tumor growth in vitro and in vivo. *Oncogene* 22: 6359-6368
- [145] Diaferia G, Cattaneo M, Saltini G, et al. (2004) RNA-mediated interference indicates that SEL1L plays a role in pancreatic beta-cell growth. *DNA Cell Biol* 23: 510-518
- [146] Kaneko M, Yasui S, Niinuma Y, et al. (2007) A different pathway in the endoplasmic reticulum stress-induced expression of human HRD1 and SEL1 genes. *FEBS Lett* 581: 5355-5360
- [147] Bastar I, Seckin S, Uysal M, Aykac-Toker G (1998) Effect of streptozotocin on glutathione and lipid peroxide levels in various tissues of rats. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 102: 265-272
- [148] Rooman I, De Medts N, Baeyens L, et al. (2006) Expression of the Notch signaling pathway and effect on exocrine cell proliferation in adult rat pancreas. *Am J Pathol* 169: 1206-1214
- [149] Path G, Opel A, Knoll A, Seufert J (2004) Nuclear protein p8 is associated with glucose-induced pancreatic beta-cell growth. *Diabetes* 53 Suppl 1: S82-85
- [150] Okabayashi Y, Ohki A, Sakamoto C, Otsuki M (1985) Relationship between the severity of diabetes mellitus and pancreatic exocrine dysfunction in rats. *Diabetes Res Clin Pract* 1: 21-30
- [151] Kendzioriski C, Irizarry RA, Chen KS, Haag JD, Gould MN (2005) On the utility of pooling biological samples in microarray experiments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 4252-4257
- [152] Guidato S, Itasaki N (2007) Wnt retained in the endoplasmic reticulum inhibits Wnt signaling by reducing cell surface LRP6. *Dev Biol* 310: 250-263
- [153] Thompson CC, Sisk JM, Beaudoin GM, 3rd (2006) Hairless and Wnt signaling: allies in epithelial stem cell differentiation. *Cell Cycle* 5: 1913-1917
- [154] Cattaneo M, Fontanella E, Canton C, Delia D, Biunno I (2005) SEL1L affects human pancreatic cancer cell cycle and invasiveness through modulation of PTEN and genes related to cell-matrix interactions. *Neoplasia* 7: 1030-1038
- [155] Gunton JE, Kulkarni RN, Yim S, et al. (2005) Loss of ARNT/HIF1beta mediates altered gene expression and pancreatic-islet dysfunction in human type 2 diabetes. *Cell* 122: 337-349
- [156] Planas R, Carrillo J, Sanchez A, et al. (2009) Gene expression profiles for the human pancreas and purified islets in type 1 diabetes: new findings at clinical onset and in long-standing diabetes. *Clin Exp Immunol* 159: 23-44



Gra de Fajol

2708 m

ARTÍCULOS

Research article

Open Access

Molecular mechanisms of tungstate-induced pancreatic plasticity: a transcriptomics approach

Jordi Altirriba^{1,2}, Albert Barbera¹, Héctor Del Zotto³, Belen Nadal^{1,2}, Sandra Piquer^{1,2}, Alex Sánchez-Pla^{4,5}, Juan J Gagliardino³ and Ramon Gomis*^{1,2}

Address: ¹Diabetes and Obesity Laboratory, Endocrinology and Nutrition Unit, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Hospital Clinic de Barcelona, Barcelona, Spain, ²Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Spain, ³Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada (CENEXA), Universidad Nacional de La Plata – Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (UNLP-CONICET), Facultad de Ciencias Médicas, UNLP, La Plata, Argentina, ⁴Department of Statistics, University of Barcelona, Barcelona, Spain and ⁵Statistics and Bioinformatics Unit, Institut de Recerca Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

Email: Jordi Altirriba - jaltirri@clinic.ub.es; Albert Barbera - abarbera@clinic.ub.es; Héctor Del Zotto - hdelzotto@yahoo.com.ar; Belen Nadal - bnadal@ub.edu; Sandra Piquer - spiquer@clinic.ub.es; Alex Sánchez-Pla - asanchez@ub.edu; Juan J Gagliardino - cenexa@speedy.com.ar; Ramon Gomis* - rgomis@clinic.ub.es

* Corresponding author

Published: 28 August 2009

Received: 7 January 2009

BMC Genomics 2009, 10:406 doi:10.1186/1471-2164-10-406

Accepted: 28 August 2009

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/10/406>

© 2009 Altirriba et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Sodium tungstate is known to be an effective anti-diabetic agent, able to increase beta cell mass in animal models of diabetes, although the molecular mechanisms of this treatment and the genes that control pancreas plasticity are yet to be identified. Using a transcriptomics approach, the aim of the study is to unravel the molecular mechanisms which participate in the recovery of exocrine and endocrine function of streptozotocin (STZ) diabetic rats treated with tungstate, determining the hyperglycemia contribution and the direct effect of tungstate.

Results: Streptozotocin (STZ)-diabetic rats were treated orally with tungstate for five weeks. Treated (STZ)-diabetic rats showed a partial recovery of exocrine and endocrine function, with lower glycemia, increased insulinemia and amylasemia, and increased beta cell mass achieved by reducing beta cell apoptosis and raising beta cell proliferation. The microarray analysis of the pancreases led to the identification of three groups of differentially expressed genes: genes altered due to diabetes, genes restored by the treatment, and genes specifically induced by tungstate in the diabetic animals. The results were corroborated by quantitative PCR. A detailed description of the pathways involved in the pancreatic effects of tungstate is provided in this paper. Hyperglycemia contribution was studied in STZ-diabetic rats treated with phloridzin, and the direct effect of tungstate was determined in INS-IE cells treated with tungstate or serum from untreated or treated STZ-rats, observing that tungstate action in the pancreas takes places via hyperglycemia-independent pathways and via a combination of tungstate direct and indirect (through the serum profile modification) effects. Finally, the MAPK pathway was evaluated, observing that it has a key role in the tungstate-induced increase of beta cell proliferation as tungstate activates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway directly by increasing p42/p44 phosphorylation and indirectly by decreasing the expression of raf kinase inhibitor protein (Rkip), a negative modulator of the pathway.

Conclusion: In conclusion, tungstate improves pancreatic function through a combination of hyperglycemia-independent pathways and through its own direct and indirect effects, whereas the MAPK pathway has a key role in the tungstate-induced increase of beta cell proliferation.

Background

The endocrine pancreas is continually remodelled [1] in a dynamic process involving the death and regeneration of beta cells. Though several mechanisms have been implicated in adult beta cell maintenance and renewal [2], it has been demonstrated that the proliferation of differentiated beta cells is the major mechanism for the maintenance of adult beta cell mass [3]. Nevertheless, it has recently been shown that endogenous progenitors can participate in the increase in beta cell mass in adult mice [4].

Studies in several animal models of diabetes have shown sodium tungstate to be an effective anti-diabetic agent, able to reverse hyperglycemia [5-9]. Tungstate treatment normalizes liver glucose metabolism in streptozotocin (STZ) and Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rats [5,7], improves beta cell function in neonatal streptozotocin (nSTZ) rats [6], and also decreases hypertriglyceridemia in ZDF-rats [7]. In nSTZ-rats, tungstate not only restores glucose-induced insulin secretion, but also completely regenerates beta cell mass, leading to normoglycemia in animals even after withdrawal of the treatment [9]. Sodium tungstate has also been shown to exert insulin-mimetic effects in isolated hepatocytes [10] and to increase insulin content and enhance insulin secretion in the presence of glucose and various secretagogues in an insulinoma cell line and the perfused pancreas [11,12].

The aim of this study is to unravel the molecular mechanisms of tungstate action in the pancreas. Streptozotocin is a diabetogenic compound and is known to specifically destroy beta cells in the pancreas, obtaining a diabetic animal model with impaired endocrine and exocrine function and reduced beta cell mass. In this model, we identified the pancreatic gene expression changes induced by the streptozotocin damage and the partial recovery of function after treatment with tungstate. The data presented here show that tungstate treatment modifies the expression of a set of genes which participate in the tungstate-induced pancreatic plasticity, with a recovery of exocrine function and a partial recovery of endocrine function and beta cell mass. Moreover, we demonstrate that most of these effects are independent of the recovery of hyperglycemia and due to direct and indirect effects of tungstate in the pancreas. Further study of these pathways may lead to the discovery of new strategies for modifying pancreatic plasticity.

Results

Effects of tungstate treatment on blood and beta cell parameters

As previously described [5,8], administration of sodium tungstate significantly decreased glycemia in STZ-rats, while no changes were observed in the healthy animals (Figure 1a). Similarly, the administration of tungstate to

STZ-rats also increased beta cell mass, though without reaching the levels found in the healthy animals (percentage of insulin area in the total pancreatic area, healthy untreated [HU]: 1.77 ± 0.27 , healthy treated [HT]: 1.82 ± 0.26 , diabetic untreated [DU]: 0.05 ± 0.01 $p < 0.01$ vs. HU, diabetic treated [DT]: 0.20 ± 0.05 $p < 0.01$ vs. both DU and HU, $n = 6$). In agreement with previous reports [8], tungstate treatment did not induce any significant modification in the healthy animals, and consequently, no further morphological analysis of these animals was performed. Figure 1b shows representative images of insulin-immunostained pancreas. Moreover, tungstate treatment in the diabetic animals also induced a significant increase in the number of positive insulin and Pdx-1 cells in the islets (Figures 1c and 1d). In order to understand the mechanisms involved in the increase in beta cell mass, we measured beta cell replication and apoptosis rates. As shown in Figure 1e, the diabetic rats had a higher number of apoptotic cells than the healthy animals. The treatment significantly decreased the rate of beta cell apoptosis, reaching levels comparable to those found in the healthy animals (Figure 1e). Moreover, tungstate increased beta cell replication in the diabetic animals (Figure 1f). These increases in beta cell mass and function were accompanied by a significant increase in blood insulin levels in the diabetic treated animals (Figure 1g). Therefore, the increased beta cell mass observed could be ascribed to a combination of the recovery of the apoptotic levels and the increased proliferation levels. This rise does not normalize beta cell mass, probably due to the extremely low levels of beta cell mass in the STZ-rats and the cells' limited capacity for recovery and replication. Nevertheless, the stimulation of the treatment permits a four-fold increase in beta cell mass and a two-fold increase in insulinemia in the animals. Moreover, although streptozotocin is a beta cell-specific toxin, it has also been reported that STZ-rats have impaired exocrine function [13], which was confirmed by the lower blood amylase levels in the diabetic animals; these levels were also improved by tungstate administration (Figure 1h).

Gene expression profile of diabetic treated animals

To understand the underlying molecular mechanisms of tungstate action in the pancreas and to identify the tungstate target genes, we used microarrays to determine the gene expression in the four experimental groups. We performed microarrays of the whole pancreas in order to evaluate the possible signals coming from exocrine, ductal and endocrine tissue which might explain the phenotype observed. The differential expression analysis identified 370 differentially expressed genes, with clustered values (Figure 2a). The heat diagram clearly shows that the genes selected make it possible to distinguish between the healthy and diabetic groups, and between the treated and untreated diabetic samples. This distinction elegantly mimics the glycaemic phenotype observed: the glycaemia

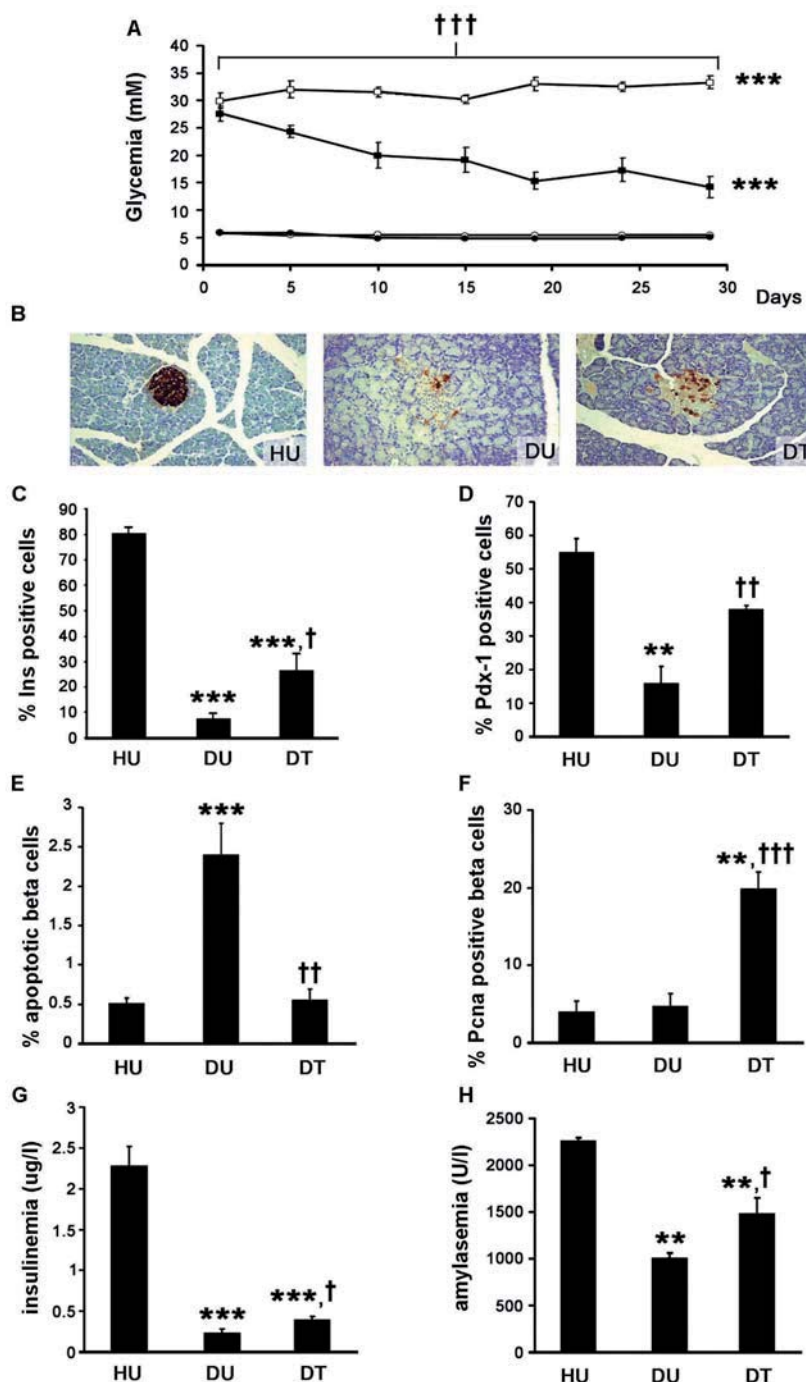


Figure 1
Effects of tungstate administration on blood and beta cell parameters. **a** Glycemia evolution of healthy untreated (open circles), healthy treated (filled circles), diabetic untreated (blank squares) and diabetic treated (filled squares) rats, n = 9. **b** Representative images of pancreatic sections stained with insulin (magnification 20×) for HU, DU and DT. **c, d** The percentage of insulin (**c**) and Pdx-1 (**d**) positive cells in the islets was analyzed from the pancreas (at three different levels), n = 6. **e, f** Beta cell apoptosis (**e**) and proliferation (**f**) were assessed by propidium iodide and PcnA staining, respectively, n = 8–10. **g, h** Insulin (**g**) and amylase (**h**) serum levels at the end of the tungstate treatment, n = 8–10. ***p < 0.001 and **p < 0.01 compared to healthy untreated animals, †††p < 0.001, ††p < 0.01 and †p < 0.05 compared to diabetic untreated animals.

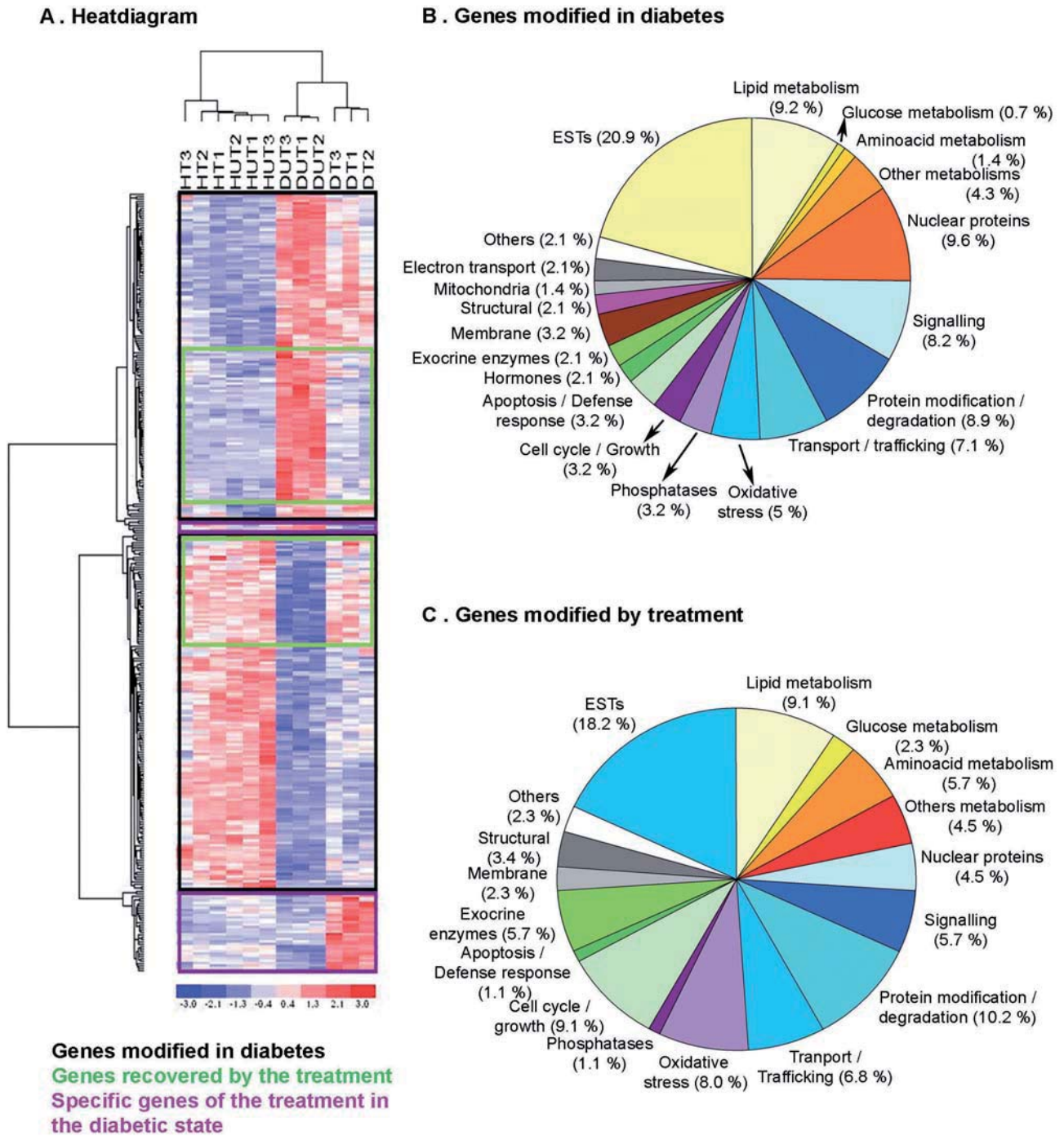


Figure 2
Differential gene expression in the pancreas of the diabetic untreated and treated animals. **a** Clustering of all the genes differentially expressed (horizontally) and the samples from the different experimental groups (vertically) using the dChip software. **b, c** Functional classification of the genes differentially expressed in the pancreas of diabetic animals (**b**) and in the pancreas of diabetic treated animals (**c**). The analysis of the arrays and identification of the differentially expressed genes was performed as described in Additional file 9. The functional classification of the genes was performed with the help of the NetAffx and GeneOntology databases.

pattern and gene profile are similar in the treated and untreated healthy animals, but not in the treated and untreated diabetic animals. Moreover, the heat diagram grouped these genes in three different clusters: genes modified by diabetes, genes whose expression was restored by the treatment, and genes modified only in the diabetic treated animals.

In Figure 2b, the 282 genes differentially expressed due to diabetes are grouped according to their function [for a complete list, see Additional file 1]. The analysis of the arrays from DT animals identified 88 differentially expressed genes (see Figure 2c for functional clustering, and Additional file 2 for the complete list). The majority of these genes (70%) represented genes whose expression was restored, in varying degrees, by the tungstate treatment. Among these genes are the ones involved in metabolism, protein modification, oxidative stress, and so on, showing that the treatment acts on several pathways which lead to the recovery of pancreatic function. Only 28 of the 88 genes were differentially expressed in DT animals alone [see Additional file 3].

Validation of the array results

After an exhaustive bibliographical research, from the list of all the genes modified by tungstate in the diabetic animals we chose a selection of genes whose function would help us to explain the effects observed in the pancreas of the tungstate-treated diabetic animals (further information available in Additional file 4 and Discussion), and we rechecked their expression using quantitative PCR. The genes chosen were transforming growth factor beta 3 (*Tgfb3*), fibroblast growth factor 13 (*Fgf13*), X-box binding protein 1 (*Xbp1*), uterine sensitization-associated gene-1 (*Usag-1*), tetraspanin 8 (*Tspn8*), suppressor of lin-12 1 homolog (*Sellh*), and Raf kinase inhibitory protein (*Rkip*). The analysis is shown in Figure 3a. The results were similar to those found in the microarray analysis. Interestingly, gene expression was lower in DU than in HU animals (except *Tspn8*, which was unchanged, and *Rkip*, which was increased), whereas in DT animals, gene expression increased significantly as compared to DU, and sometimes it even surpassed HU. Insulin 2 and amylase were also included as controls. As in the microarrays and in the biochemical data, the expression of these genes was extremely low (almost zero) in the DU rats, and tungstate treatment partially restored amylase expression (a 45.98 ± 10.97 fold increase DT *vs.* DU, $p < 0.01$) and increased insulin expression (a 4.49 ± 1.10 fold increase DT *vs.* DU, $p < 0.001$).

Tungstate effects are independent of glycemia normalization

Hyperglycemia has a critical impact on beta cell function [14] and gene expression [15]. To assess the involvement

of the decrease in the hyperglycemia on tungstate effects, we decided to explore whether the gene expression changes induced by the treatment were just the consequence of the decrease in glycemia observed in the diabetic treated animals. To do so, diabetic rats were treated with phloridzin, which selectively inhibits active glucose reabsorption in the kidneys and, as opposed to insulin administration, leads to a decrease in glycemia without any direct effect on pancreas function. Phloridzin administration led to a significant decrease in glycemia, though healthy values were not attained; interestingly, the levels reached were quite similar to those observed in DT animals (Figures 3b and 1a). Analysis of the expression of the genes validated by Real Time PCR showed that most did not present significant differences between the phloridzin administrated animals and their control counterparts (Figure 3c). Nevertheless, *Sellh* and insulin expression increased significantly (insulin: 1.82 ± 0.32 fold increase, *Sellh*: 1.45 ± 0.18 fold increase, $p < 0.05$ *vs.* untreated animals), although this increase was lower than the one observed in the tungstate-treated diabetic rats (insulin: 4.49 ± 1.10 fold increase, *Sellh*: 4.21 ± 0.31 , $p < 0.001$ *vs.* DU). Nuclear protein 1 (*Nupr1*), which has been shown to be regulated by glucose levels [16], was included as a positive control, and, as expected, it was significantly reduced in phloridzin-treated animals. Therefore, we conclude that tungstate effects on gene expression are independent of the decrease in glycemia.

Tungstate increases beta cell proliferation indirectly through the modification of the serum profile

Tungstate administration to the diabetic animals increased beta cell proliferation. This increase was responsible, at least partially, for the beta cell mass recovery observed in the diabetic animals. Firstly, we assessed whether tungstate alone in culture was able to increase beta cell proliferation. As shown in Figure 4a, in culture, tungstate slightly increased INS-1E proliferation. However, this increase was much lower than the one observed *in vivo*; therefore, we wondered whether tungstate administered *in vivo* was able to exert a greater effect due either to the action of one of its metabolites or due to some indirect mechanisms. To shed some light on the matter, we cultured INS-1E cells in the presence of serum from the treated animals. Surprisingly, the sera from the diabetic treated rats were able to enhance INS-1E proliferation (Figure 4b). This increase was greater than the one observed when the cells were treated with tungstate directly. Moreover, when tungstate was added to a medium containing foetal bovine serum, no differences were observed (data not shown), suggesting that tungstate was not acting through the enhancement of some trophic factors present in the serum. In conclusion, tungstate acts on beta cell proliferation in diabetic animals probably through an indirect mechanism.

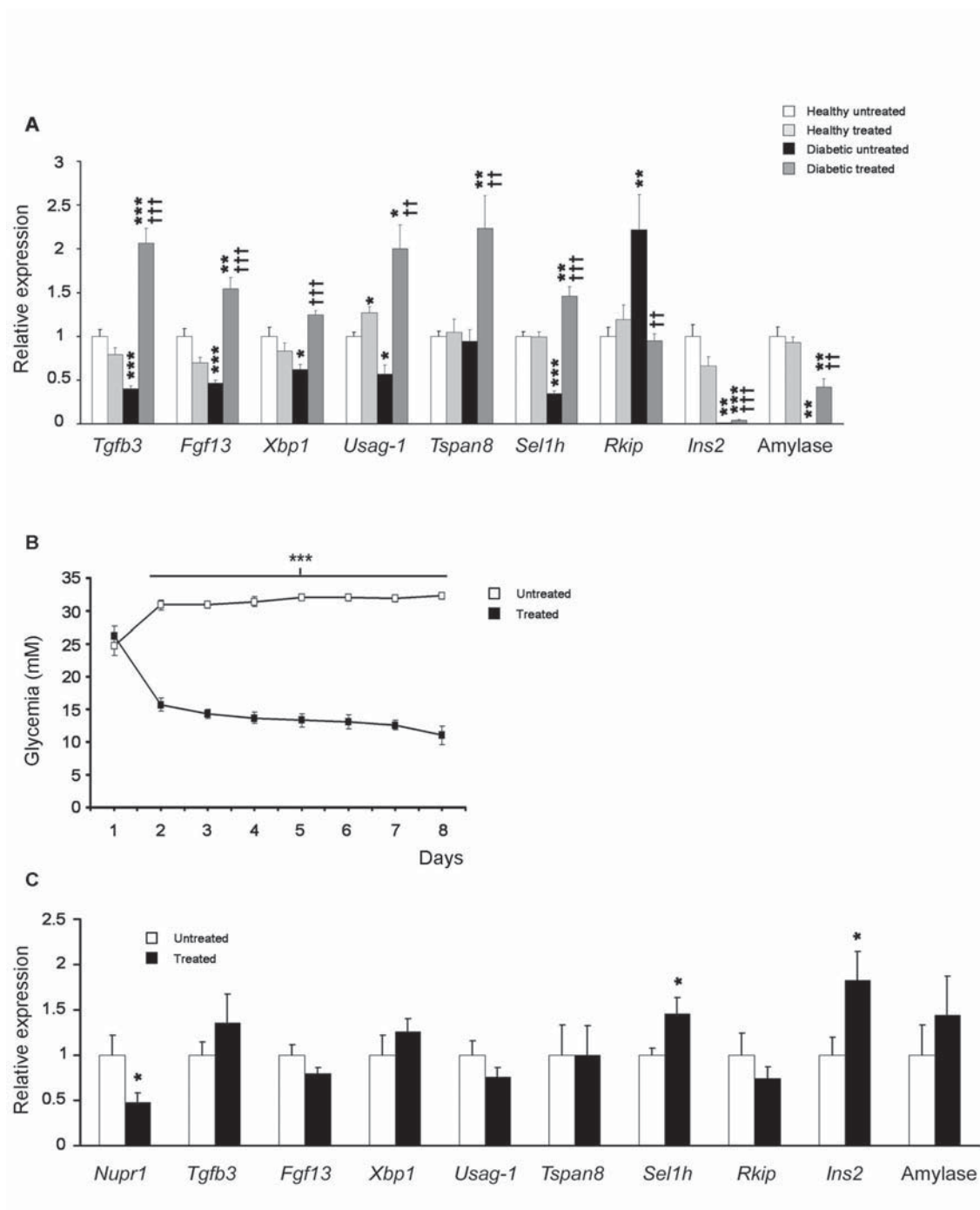


Figure 3
Tungstate effects on the genes identified using the microarrays are specific and independent of glycemia normalization. **a** From the list of specific genes modified in the diabetic treated animals, a significant number were chosen to corroborate the difference in expression levels detected by microarray analysis, using Real Time PCR, n = 7. ***p < 0.001, **p < 0.01 and *p < 0.05 compared to healthy untreated animals, †††p < 0.001, ††p < 0.01 and †p < 0.05 compared to diabetic untreated animals. **b** Diabetic animals were treated with phloridzin to decrease glycemia. Blood glucose levels during phloridzin administration, n = 12. ***p < 0.001 compared to vehicle treated animals. **c** mRNA expression levels from the pancreas of phloridzin treated animals were analyzed by Real Time PCR, n = 10. *p < 0.05 compared to vehicle treated animals.

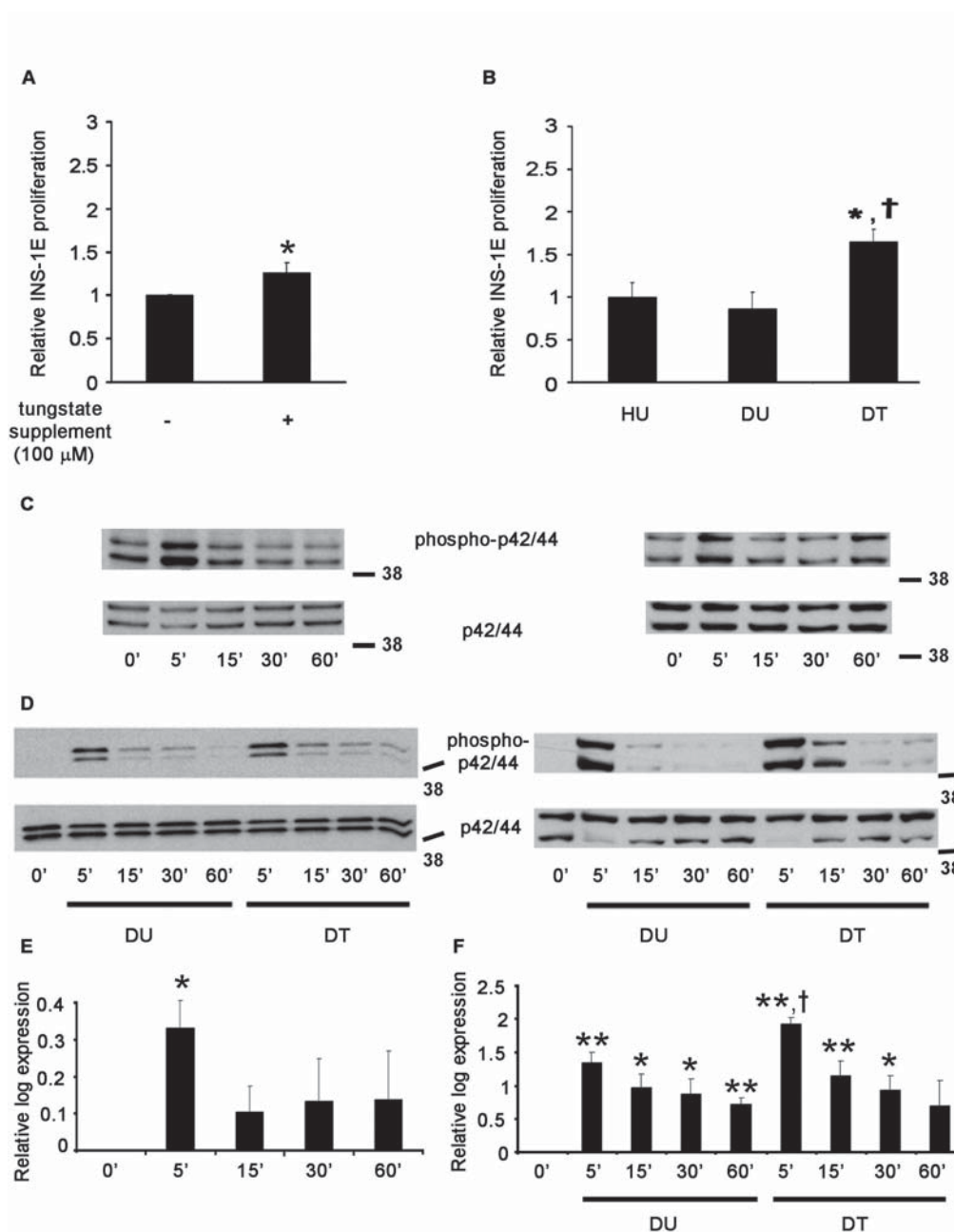


Figure 4

Effects of tungstate and serum from tungstate treated animals on beta cell proliferation and analysis of p42/44 phosphorylation capacity.

a Tungstate induction of INS-1E proliferation. INS-1E cells were cultured with or without tungstate (100 μM) in the absence of fetal bovine serum. n = 5, *p < 0.05 vs. control. **b** Serum from diabetic treated animals enhances INS-1E proliferation. The cells were cultured in RPMI media containing 10% of the serum from the animals of each experimental group (HU, DU and DT). Serum samples were obtained after 5 weeks treatment with tungstate. n = 5. *p < 0.05 vs. healthy untreated animals and †p < 0.05 compared to diabetic untreated animals. **c-f** INS-1E cells were treated (**c** and **e**) with tungstate, or with serum from the untreated and treated diabetic animals (**d** and **f**) for the minutes indicated. Lysates were immunoblotted (representative Western blots are shown, **c-d**), quantified (**e-f**) and expressed as the logarithmic fold change of phosphorylated p42/44 protein normalized by the total quantity of p42/44 for each time point vs. time 0 (n = 4–5). **p < 0.01 and *p < 0.05 vs. time 0 and †p < 0.05 as compared to the same point time in the samples treated with serum from the diabetic untreated animals.

MAPK pathway is involved in tungstate induced beta cell proliferation

Among several other cellular functions, the MAPK pathway plays a key role in cell replication [17]. One of the tungstate-specific genes that we have analyzed is *Rkip*, which is involved in the fine tuning of this important pathway in the islets through the inhibition of Raf-1 [18]. This gene was increased in the diabetic untreated animals compared to untreated healthy rats (inhibiting the MAPK p42/44 pathway), and the treatment returned its levels to normal (re-establishing MAPK p42/44 signalling) (Figure 3a). Moreover, previous studies [10] have demonstrated that sodium tungstate is able to activate the MAPKp42/44 pathway by increasing p42/44 phosphorylation in hepatocytes. Therefore, we decided to further evaluate the role of the MAPK pathway in tungstate-induced beta cell replication. We observed that tungstate was able to stimulate the MAPK pathway in INS-1E (Figure 4c and 4e). Similarly, the serum from the diabetic treated animals was also able to enhance the MAPK pathway more strongly than the serum from the untreated animals (notice the different scales used in Figures 4e and 4f); in addition, the activation of the pathway lasted longer (Figures 4d and 4f). This MAPKp42/44 activation pattern mimics the findings observed with the INS-1E proliferation in the presence of tungstate and serum from the different animals, showing also that serum from diabetic treated animals is a more potent proliferative agent and activator of the MAPK p42/44 pathway. Since it seemed that the stimulation of beta cell replication was linked to MAPK activation, we decided to culture INS-1E cells with PD98059, a MAPK/ERK kinase 1 (Mek1) inhibitor [19]. In the presence of PD98059, the serum from the treated animals induced a lower stimulation of beta cell replication (62% reduction, $p < 0.05$, $n = 6$), but no significant effect was seen in the serum from the untreated animals (8% reduction, $p = n.s.$, $n = 6$). These data suggest that in order to exert its effects on beta cell replication, tungstate has to activate the MAPK pathway by both short-term (direct activation) and long-term mechanisms (normalization of *Rkip* expression), probably through an indirect mechanism involving either tungstate metabolization or the stimulation of some beta cell trophic factor(s).

Discussion

This paper focuses on the molecular mechanisms by which tungstate administration modulates pancreatic plasticity in diabetic animals. We selected the streptozotocin rat model, which shows a high degree of pancreatic damage at both endocrine and exocrine levels [20]. In this situation, tungstate administration partially restores glycemia, insulinemia and amylaseemia. Moreover, the morphological results clearly demonstrate that treatment increased beta cell mass in the pancreas and increased insulin and Pdx-1 positive cells in the islets. This increased beta cell mass can be ascribed, at least in part, to a combi-

nation of a decrease in beta cell apoptosis and an increase in islet proliferation.

In agreement with the metabolic phenotype, the pancreatic microarray analysis found no differences in the gene expression pattern between HU and HT animals, but it showed a very different pattern in DU animals as compared with both healthy samples. These changes are found not only in genes linked to endocrine function but also in those linked to exocrine function, probably due to the toxic effects of STZ. Finally, DT animals presented a specific pattern which was different from both DU animals and healthy animals, due to the effects of sodium tungstate on the diabetes background.

The analysis of the microarray data led us to propose a model of tungstate action (Figure 5) which could explain the general improvement in the exocrine and endocrine pancreatic function of the diabetic animals treated with sodium tungstate. To understand these effects, we should bear in mind that tungstate is able to inhibit phosphatase activity due to its chemical properties [21]. Our group and others have shown that, probably as a result of this property, tungstate treatment increases the phosphorylation of key proteins of different pathways [9,10] and is probably responsible for the effects of tungstate in diabetic animals. Thus, the combination of these two actions – modification of gene expression and enhancement of phosphorylation – may cooperate synergistically to increase beta cell mass, which, together with the improvement of hepatic metabolism [5], would lead to a decrease in hyperglycemia.

In relation to the recovery of exocrine function, we should mention the possible role of *Xbp1*. This gene plays a key role in the unfolded protein response [22], and *Xbp1* knockout animals display abnormalities exclusively in secretory organs such as the exocrine pancreas, which lead to early postnatal lethality [23]. In our model, we found *Xbp1* to be decreased in the DU animals and increased in the DT animals concomitantly to the recovery of the amylase expression, a finding that stresses the important role of this gene in the correct function of the exocrine machinery.

Several genes whose expression was modified by tungstate administration to diabetic animals may be responsible for the recovery of pancreatic function. Those genes are involved in different pathways which control a wide range of physiological functions, covering growth and differentiation to morphogenesis and angiogenesis. Therefore, it is probably the combination of tungstate effects upon all these pathways that leads to the recovery of pancreatic function. Since we performed microarrays using the total pancreas, we cannot identify the exact sites of these changes (exocrine, endocrine or ducts). Nevertheless, it

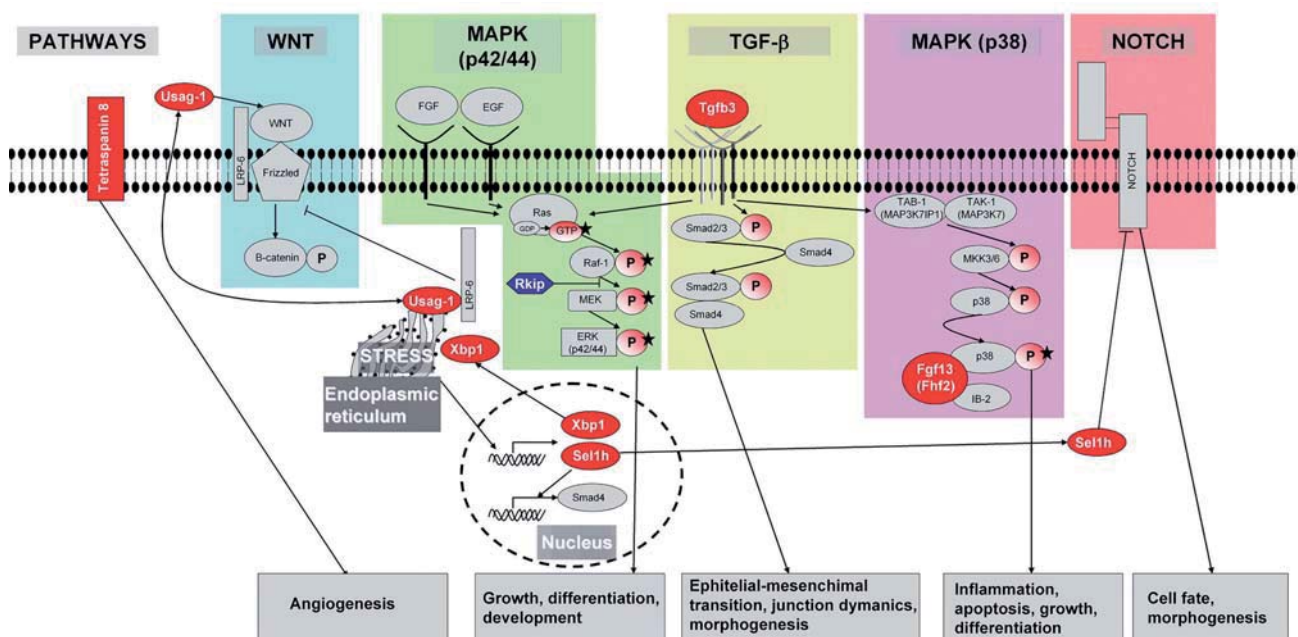


Figure 5
Pathways involved in the effects of tungstate on the pancreas. Microarrays from diabetic treated animals show that tungstate is acting through many interconnected pathways, which lead to an overall improvement of pancreas function. Some of the genes found are over-expressed (red) or diminished (blue) in diabetic treated animals and are involved in the control of several cellular pathways, either activating (arrows) or repressing (lines with a perpendicular line at the end). The final effects of the activation or inhibition of these pathways are described at the bottom of the figure. Moreover, the phosphorylations are represented as circles with a P inside, and the tungstate effects described for enhancing the phosphorylation of different key proteins are shown with a black star [9,10,25].

seems that their modulation may contribute to the pancreatic regeneration observed in the diabetic treated animals. *Fgf13* is one of the genes modified in the diabetic treated animals. *Fgf13* binds to islet-brain 2, recruiting p38δ and increasing the activity of this kinase [24]. Interestingly, it has already been shown that tungstate increases the phosphorylation of p38 in both MIN6 beta cells [25] and islets of nSTZ-rats [9], which may lead to the improvement observed in the pancreatic beta cell population. Another modified gene was *Tspn8*, which may exert tumor-promoting activities by increasing cell motility and by inducing angiogenesis [26]. Therefore, bearing in mind that STZ damage provokes severe microcirculatory disturbances within pancreatic islets [27], we propose that an increase in the *Tspn8* expression may improve pancreas revascularization and enhance islet function. Finally, other interesting genes are *Tgfb3*, *Usag-1* and *Sel1h*. *Tgfb3* plays a key role in complex processes including epithelial to mesenchymal transition [28], which is relatively important in pancreas regeneration [29,30]. *Usag-1* modulates Wnt and Bone Morphogenic Protein signaling [31-33] in different ways. *Sel1h* has been implicated as a Notch inhibitor in exocrine [34] and endocrine replication [35]

and modifies the expression of genes involved in cell-matrix interactions and in the cell cycle [36]. Although the exact role of these genes in pancreatic regeneration has not been investigated in detail, we hypothesize that the combined action of these multiple pathways leads to the regeneration of the pancreas observed in the DT rats.

Although many pathways are involved in tungstate action, the results clearly show that the MAPK pathway plays a key role. The array analysis showed normalization in *Rkip* expression in the DT animals. This protein binds to v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1 (Raf-1), leading to the blockage of Mek and extracellular-signal-regulated kinase 1 (Erk) activation. It has been shown that, in the pancreas, *Rkip* localizes specifically in the islets and is involved in the regulation of beta cell growth. When this gene is up-regulated, as in the case of the DU animals, it acts as a brake on the MAPK signaling and beta cell proliferation [18]. The normalization of *Rkip* in the DT rats would permit the unblocking of the MAPK signaling and thus allowing the proliferative signals through this pathway. In the liver, it has been shown that tungstate enhances glycogen synthesis through MAPK activation

[10]. Here we demonstrate that tungstate activates MAPK both directly and indirectly and is crucial for the tungstate-induced increase observed in beta cell replication. On the one hand, tungstate enhances MAPK phosphorylation; on the other, it normalizes *Rkip* expression which also leads to an increase in the MAPK pathway tone. The combination of these two mechanisms is the cause of the increased beta cell proliferation observed in our study.

Conclusion

In summary, tungstate is able to increase beta cell mass and recovers the exocrine and partially endocrine function in STZ-rats. These improvements in pancreatic function require the combined action of several pathways, such as Wnt, TGF- β , Notch and MAPK. The last of these is clearly involved in the increase in beta cell mass. This study identifies several proteins that may play a key role in the improvement of pancreatic plasticity. Further studies will help us to identify their precise role in the pancreas.

Methods

Animals, induction of diabetes and tungstate treatment

Principles of laboratory animal care were followed (European and local government guidelines) and protocols were approved by the Animal Research Committee of the University of Barcelona. Diabetes induction and tungstate treatment have been described previously [8]. Diabetes was induced in adult male Wistar rats (225 g) obtained from Charles River (Wilmington, MA, USA) by an intraperitoneal STZ (Sigma, St Louis, MO, USA) injection (70 mg/Kg). At the beginning of the experiment, both diabetic and healthy animals were randomly divided into two groups. For 5 weeks, treated rats received *ad libitum* a solution of 2 mg/ml sodium tungstate (Carlo Erba, Rodano, Italy) in deionized water; whereas the untreated rats received deionized water alone (daily sodium tungstate intake: healthy 71 mg, diabetic 110 mg). Therefore, the study had 4 experimental groups (healthy untreated [HU], healthy treated [HT], diabetic untreated [DU] and diabetic treated [DT]). Glycemia was measured every 5 days. At the end of the experiment, blood was collected, and serum was obtained. For islet studies, islets were isolated by collagenase digestion, as previously described [9].

Phloridzin administration

In an additional group of animals, diabetes was induced by STZ injection, as described in the previous section. Once the hyperglycemia was confirmed, these diabetic animals were subdivided into two groups, one group (control) which received the vehicle used to dissolve phloridzin; and the other group (treated) which received phloridzin as previously described [37]: phloridzin (Sigma) was dissolved (40%) in propylene glycol (Sigma) and injected intraperitoneally every 8 h during 1 week at a dose of 2 g/Kg body weight per day. Phloridzin treated

rats also underwent a caloric restriction of 0.1 g chow diet/Kg body weight per day.

Insulinemia and amylasemia

Insulinemia was measured by radioimmunoassay (CIS, Gif-sur-Yvette, France), and amylasemia was determined in an Advia Analyzer 2400 (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Munich, Germany)

Immunohistochemical studies and beta cell analysis

The whole pancreas was removed, fixed and embedded in paraffin. Serial sections of pancreas (5 μ m) were obtained from three different levels. Beta cells were located using a modified avidin-biotin-peroxidase method [38]. The morphometric analysis was performed using OPTIMAS™ (Bioscan Incorporated, Edmonds, WA, USA) software. We also stained for pancreatic duodenal homeobox-1 (Pdx-1) (kindly provided by Dr. C. Wright), quantifying the percentage of Pdx-1-labeled cells within the islet cells (not less than 1000 cells were counted).

Cell replication rates

Sequential-dual staining for proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (Sigma) and insulin (Dako, Glostrup, Denmark) was performed. Replication rate was quantified and expressed as the percentage of PCNA-labeled cells among the total beta cells counted (not less than 3000 each). Immunohistochemical stainings have been validated in previous studies [39,40].

Apoptotic rate

To identify apoptotic bodies, we used the propidium iodide technique [1]. Deparaffinized and rehydrated sections were incubated for 30 minutes in a solution of propidium iodide (4 μ g/ml, Sigma) and RNase A (100 μ g/ml, Sigma). For the quantitative evaluation, positively labeled apoptotic endocrine cells were counted, and the number of apoptotic cells was expressed as the percentage of the total number of beta cells counted.

RNA isolation

RNA was isolated from fresh total pancreas using the RNeasy Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, USA). Islet RNA was isolated with the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands). RNA integrity was analyzed using a Lab-on-a-chip in a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

Microarrays

Total RNA from 3 rat pancreases of the same experimental group was pooled in equal proportions and hybridized to a Rat GeneChip RAE230-A (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). In total, 12 microarrays were hybridized using 3 different pools of each experimental group. The data were deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus with the accession number GDS1883. Several quality controls were

performed, as described previously [41] [see Additional file 5, 6, 7 and 8], and analyzed, as described in Additional file 9, using Affy [42,43], AffyPLM [44] and LIMMA [45] packages from Bioconductor [46] on R language [47,48] and dChip software [49].

Values for clustering were obtained after standardizing the gene values: the mean value of each gene was subtracted from the value of this gene in each array and was divided by the standard deviation of this gene in all the arrays. Clustering was performed with a distance metric of 1 – correlation, centroid linkage method and gene ordering by cluster tightness

Real Time PCR

Total RNA was retrotranscribed with SuperscriptIII (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Real Time PCR was carried out in a 7900 HT Real Time System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using SYBR Green fluorophor. The primers used are described in Additional file 10. A standard curve of each primer set was generated from serial dilutions of cDNA. The PCR products were verified by way of dissociation curve analysis using SDS software (Applied Biosystems). Expression levels obtained were normalized with a housekeeping gene (TATA box binding protein) and were scaled to the mean of the values of the same gene found in the healthy untreated animal.

Western Blot

Western blotting was performed as described previously [9], using a specific antibody against phospho-p42-p44 MAPK (Thr202/Tyr204; Cell signaling, Danvers, MA, USA). Membranes were then stripped and incubated with anti-p42-p44 MAPK (Cell signaling). Intensity values were obtained with Image Gauge 4.0 software (Fujifilm, Valhalla, NY, USA). These values were divided by the value obtained at time 0, in order to normalize the data and permit comparisons among experiments performed on different days. Finally, data was log 2 transformed in order to obtain additive normally distributed noise and to stabilize variance [50].

Cell proliferation

INS-1E cells (kindly provided by Dr P. Maechler) were maintained as described elsewhere [51]. For serum proliferation studies, two days after seeding, the medium was substituted by a medium containing RPMI1640 (Biosera, Ringmer, UK), BSA 0.1%, glucose 5 mmol/l and sodium tungstate at 100 µmol/l (Carlo Erba) or 10% of the serum from the animals. 24 hours later, hydroxyurea 12.5 mmol/l (Sigma) was added to the medium. 24 hours later, the medium was removed, and wells were cleaned with DPBS (Sigma). A medium with the initial composition supplemented with methyl-3H-Thymidine 1 µCi (initial specific activity 74 GBq/mmol) (GE Healthcare,

Fairfield, CT, USA) was added to each well for 4 hours. Plates were then frozen and defrosted, cells were harvested with a Cell Harvester, and cpm was measured with a 1205 BetaPlate liquid scintillation counter (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA).

Phosphorylation studies

Two days after seeding INS-1E cells, in order to decrease basal phosphorylation levels, the medium was substituted by RPMI1640 without any supplement. Eight hours later, the medium was substituted by RPMI1640 complemented with 10% of the serum from animals of the different experimental groups or sodium tungstate (100 µmol/l). After 0, 5, 15, 30 and 60 minutes, the plates were rinsed with DPBS and frozen.

Statistical analysis

Quantitative data are expressed as means ± SEM. The statistical significance was determined by Student's *t*-test (when only two groups were analyzed: glycaemia of the phloridizin treated animals, Real-time PCR values of the phloridizin treated animals and tungstate treated cells replication) and ANOVA (when more than two groups were analyzed: the rest), with a Tukey's Post-Hoc test used to find the groups responsible for the statistical significance.

Authors' contributions

JA carried out the animal studies, the microarray and statistical analysis, the cellular treatments, the Real Time PCR and Western Blot experiments, and drafted the manuscript; HDZ, BN and JGG performed the pancreatic morphometrical studies; SP participated in the cellular treatments and Western Blot analysis; AS carried out the biostatistical analysis of the microarrays; AB helped in the animal treatments, AB and RG conceived the study and participated in its design and coordination; and JGG, AS, AB and RG helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Additional material

Additional file 1

Differentially expressed genes in diabetic rats. 282 genes differentially expressed due to diabetes and grouped according to their function.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2164-10-406-S1.pdf>]

Additional file 2

Differentially expressed genes in diabetic treated rats. 88 genes differentially expressed in diabetic treated animals and grouped according to their function.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2164-10-406-S2.pdf>]

Additional file 3

Description of the specific pancreatic genes differentially expressed due to the treatment in diabetic animals. 28 genes differentially expressed in diabetic treated animals alone with detailed information. These genes were selected from the list of differentially expressed genes in diabetic treated rats [see Additional file 2]. The selection criteria, in order to select those genes only significantly different in the treated diabetic animals, were that they were not present in the list of differentially expressed genes found in diabetic rats and that they presented a fold change higher than 1.25 or lower than -1.25 in the DT group, with respect to the HU group. The microarray expression values of these genes were represented using dChip. Its description includes its name, gene symbol and fold change compared to other experimental groups. The fold change between untreated healthy and untreated diabetic rats is reported in order to show that the differences in the gene's expression between the two groups are minimal. The identification of the genes differentially expressed was performed as described in Additional file 9.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2164-10-406-S3.jpeg>]

Additional file 4

Genes selected for checking. From the list of all the genes modified by tungstate in the diabetic animals we chose a selection of genes whose function would help us to explain the effects observed in the pancreas of the tungstate-treated diabetic animals. Here we describe why we selected these genes.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2164-10-406-S4.pdf>]

Additional file 5

Affymetrix quality controls of the microarrays. Microarray quality controls according to the supplier.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2164-10-406-S5.pdf>]

Additional file 6

Statistical quality controls of the microarrays. Microarray quality controls using different packages from Bioconductor.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2164-10-406-S6.pdf>]

Additional file 7

Raw and normalized data behaviour. Figures described in the additional file 6. Histograms and boxplots of the raw data (A and B) and the background adjusted, normalized and summarized data by RMA (C and D).

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2164-10-406-S7.jpeg>]

Additional file 8

AffyPLM assessment quality control. Figures described in the additional file 6. Boxplots of the normalized unscaled standard errors (NUSE boxplot, A) and boxplots of the distribution of the relative logarithmic expressions (RLE boxplot, B and C [magnificated]).

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2164-10-406-S8.jpeg>]

Additional file 9

Microarray analysis. Explanation of the microarray analysis to obtain the differentially expressed genes from each experimental group.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2164-10-406-S9.pdf>]

Additional file 10

Primers used in the Real Time PCR. Description of the primers used in the Real Time PCR.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2164-10-406-S10.pdf>]

Acknowledgements

This study was supported by grants SAF 2006/07382 (Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain), FIS 02/0483, FIS 04/2553 (Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain), SGR 2001/00378 (Generalitat de Catalunya, Spain), and by the Plan Nacional de Investigación Científica (I+D+I), Ingenio 2010, and Programa Consolider. CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas is an initiative of ISCIII (Ministerio de Ciencia e Innovación). J.A. was recipient of a grant from IDIBAPS and B.N. from the Generalitat de Catalunya. We thank M. Julià, K. Katte and M. Maudsley for their assistance.

References

- Scaglia L, Cahill CJ, Finegood DT, Bonner-Weir S: **Apoptosis participates in the remodeling of the endocrine pancreas in the neonatal rat.** *Endocrinology* 1997, **138**:1736-1741.
- Bonner-Weir S: **Islet growth and development in the adult.** *J Mol Endocrinol* 2000, **24**:297-302.
- Dor Y, Brown J, Martinez OI, Melton DA: **Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation.** *Nature* 2004, **429**:41-46.
- Xu X, D'Hoker J, Stange G, Bonne S, De Leu N, Xiao X, Castelee M Van de, Mellitzer G, Ling Z, Pipeleers D, et al.: **Beta cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas.** *Cell* 2008, **132**:197-207.
- Barbera A, Rodriguez-Gil JE, Guinovart JJ: **Insulin-like actions of tungstate in diabetic rats. Normalization of hepatic glucose metabolism.** *J Biol Chem* 1994, **269**:20047-20053.
- Barbera A, Fernandez-Alvarez J, Truc A, Gomis R, Guinovart JJ: **Effects of tungstate in neonatally streptozotocin-induced diabetic rats: mechanism leading to normalization of glycaemia.** *Diabetologia* 1997, **40**:143-149.
- Munoz MC, Barbera A, Dominguez J, Fernandez-Alvarez J, Gomis R, Guinovart JJ: **Effects of tungstate, a new potential oral antidiabetic agent, in Zucker diabetic fatty rats.** *Diabetes* 2001, **50**:131-138.
- Barbera A, Gomis RR, Prats N, Rodriguez-Gil JE, Domingo M, Gomis R, Guinovart JJ: **Tungstate is an effective antidiabetic agent in streptozotocin-induced diabetic rats: a long-term study.** *Diabetologia* 2001, **44**:507-513.
- Fernandez-Alvarez J, Barbera A, Nadal B, Barcelo-Batlloiri S, Piquer S, Claret M, Guinovart JJ, Gomis R: **Stable and functional regeneration of pancreatic beta-cell population in nSTZ-rats treated with tungstate.** *Diabetologia* 2004, **47**:470-477.
- Dominguez JE, Munoz MC, Zafra D, Sanchez-Perez I, Baque S, Caron M, Mercurio C, Barbera A, Perona R, Gomis R, Guinovart JJ: **The antidiabetic agent sodium tungstate activates glycogen synthesis through an insulin receptor-independent pathway.** *J Biol Chem* 2003, **278**:42785-42794.
- Silvestre RA, Egido EM, Hernandez R, Marco J: **Tungstate stimulates insulin release and inhibits somatostatin output in the perfused rat pancreas.** *Eur J Pharmacol* 2005, **519**:127-134.
- Liu HK, Green BD, McClenaghan NH, McCluskey JT, Flatt PR: **Long-term beneficial effects of vanadate, tungstate, and molyb-**

- date on insulin secretion and function of cultured beta cells. *Pancreas* 2004, **28**:364-368.
13. Mori DM, Baviera AM, de Oliveira Ramalho LT, Vendramini RC, Brunetti IL, Pepato MT: **Temporal response pattern of biochemical analytes in experimental diabetes.** *Biotechnol Appl Biochem* 2003, **38**:183-191.
 14. Unger RH, Grundy S: **Hyperglycaemia as an inducer as well as a consequence of impaired islet cell function and insulin resistance: implications for the management of diabetes.** *Diabetologia* 1985, **28**:119-121.
 15. Maedler K, Sergeev P, Ris F, Oberholzer J, Joller-Jemelka HI, Spinass GA, Kaiser N, Halban PA, Donath MY: **Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets.** *J Clin Invest* 2002, **110**:851-860.
 16. Path G, Opel A, Knoll A, Seufert J: **Nuclear protein p8 is associated with glucose-induced pancreatic beta-cell growth.** *Diabetes* 2004, **53**(Suppl 1):S82-85.
 17. Burns CJ, Squires PE, Persaud SJ: **Signaling through the p38 and p42/44 mitogen-activated families of protein kinases in pancreatic beta-cell proliferation.** *Biochem Biophys Res Commun* 2000, **268**:541-546.
 18. Zhang L, Fu Z, Binkley C, Giordano T, Burant CF, Logsdon CD, Simeone DM: **Raf kinase inhibitory protein inhibits beta-cell proliferation.** *Surgery* 2004, **136**:708-715.
 19. Dudley DT, Pang L, Decker SJ, Bridges AJ, Saltiel AR: **A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, **92**:7686-7689.
 20. Okabayashi Y, Ohki A, Sakamoto C, Otsuki M: **Relationship between the severity of diabetes mellitus and pancreatic exocrine dysfunction in rats.** *Diabetes Res Clin Pract* 1985, **1**:21-30.
 21. Stankiewicz PJ, Gresser MJ: **Inhibition of phosphatase and sulfatase by transition-state analogues.** *Biochemistry* 1988, **27**:206-212.
 22. Lee AH, Iwakoshi NN, Glimcher LH: **XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response.** *Mol Cell Biol* 2003, **23**:7448-7459.
 23. Lee AH, Chu GC, Iwakoshi NN, Glimcher LH: **XBP-1 is required for biogenesis of cellular secretory machinery of exocrine glands.** *Embo J* 2005, **24**:4368-4380.
 24. Schoorlemmer J, Goldfarb M: **Fibroblast growth factor homologous factors and the islet brain-2 scaffold protein regulate activation of a stress-activated protein kinase.** *J Biol Chem* 2002, **277**:49111-49119.
 25. Piquer S, Barcelo-Batlloiri S, Julia M, Marzo N, Nadal B, Guinovart JJ, Gomis R: **Phosphorylation events implicating p38 and PI3K mediate tungstate-effects in MIN6 beta cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2007, **358**:385-391.
 26. Gesierich S, Berezovskiy I, Ryschich E, Zoller M: **Systemic induction of the angiogenesis switch by the tetraspanin D6.1A/CO-029.** *Cancer Res* 2006, **66**:7083-7094.
 27. Enghofer M, Usadel KH, Beck O, Kusterer K: **Superoxide dismutase reduces islet microvascular injury induced by streptozotocin in the rat.** *Am J Physiol* 1997, **273**:E376-382.
 28. Koo SH, Cunningham MC, Arabshahi B, Gruss JS, Grant JH 3rd: **The transforming growth factor-beta 3 knock-out mouse: an animal model for cleft palate.** *Plast Reconstr Surg* 2001, **108**:938-948.
 29. Gershengorn MC, Hardikar AA, Wei C, Geras-Raaka E, Marcus-Samuels B, Raaka BM: **Epithelial-to-mesenchymal transition generates proliferative human islet precursor cells.** *Science* 2004, **306**:2261-2264.
 30. Hanley S, Rosenberg L: **Transforming growth factor beta is a critical regulator of adult human islet plasticity.** *Mol Endocrinol* 2007, **21**:1467-1477.
 31. Guidato S, Itasaki N: **Wise retained in the endoplasmic reticulum inhibits Wnt signaling by reducing cell surface LRP6.** *Dev Biol* 2007, **310**:250-263.
 32. Kassai Y, Munne P, Hotta Y, Penttila E, Kavanagh K, Ohbayashi N, Takada S, Thesleff I, Jernvall J, Itoh N: **Regulation of mammalian tooth cusp patterning by ectodin.** *Science* 2005, **309**:2067-2070.
 33. Thompson CC, Sisk JM, Beaudoin GM 3rd: **Hairless and Wnt signaling: allies in epithelial stem cell differentiation.** *Cell Cycle* 2006, **5**:1913-1917.
 34. Rooman I, De Medts N, Baeyens L, Lardon J, De Breuck S, Heimberg H, Bouwens L: **Expression of the Notch signaling pathway and effect on exocrine cell proliferation in adult rat pancreas.** *Am J Pathol* 2006, **169**:1206-1214.
 35. Diaferia G, Cattaneo M, Saltini G, Proverbio MC, Monferini E, Malferriari G, Albertini A, Biunno I: **RNA-mediated interference indicates that SEL1L plays a role in pancreatic beta-cell growth.** *DNA Cell Biol* 2004, **23**:510-518.
 36. Cattaneo M, Fontanella E, Canton C, Delia D, Biunno I: **SEL1L affects human pancreatic cancer cell cycle and invasiveness through modulation of PTEN and genes related to cell-matrix interactions.** *Neoplasia* 2005, **7**:1030-1038.
 37. Serino R, Ueta Y, Tokunaga M, Hara Y, Nomura M, Kabashima N, Shibuya I, Hattori Y, Yamashita H: **Upregulation of hypothalamic nitric oxide synthase gene expression in streptozotocin-induced diabetic rats.** *Diabetologia* 1998, **41**:640-648.
 38. Hsu SM, Raine L, Fanger H: **Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures.** *J Histochem Cytochem* 1981, **29**:577-580.
 39. Del Zotto H, Massa L, Gomez Dumm CL, Gagliardino JJ: **Changes induced by sucrose administration upon the morphology and function of pancreatic islets in the normal hamster.** *Diabetes Metab Res Rev* 1999, **15**:106-112.
 40. Del Zotto H, Massa L, Rafaeloff R, Pittenger GL, Vinik A, Gold G, Reifel-Miller A, Gagliardino JJ: **Possible relationship between changes in islet neogenesis and islet neogenesis-associated protein-positive cell mass induced by sucrose administration to normal hamsters.** *J Endocrinol* 2000, **165**:725-733.
 41. Casas S, Gomis R, Gribble FM, Altirriba J, Knuutila S, Novials A: **Impairment of the ubiquitin-proteasome pathway is a downstream endoplasmic reticulum stress response induced by extracellular human islet amyloid polypeptide and contributes to pancreatic beta-cell apoptosis.** *Diabetes* 2007, **56**:2284-2294.
 42. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP: **Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data.** *Biostatistics* 2003, **4**:249-264.
 43. Gautier L, Cope L, Bolstad BM, Irizarry RA: **affy - analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level.** *Bioinformatics* 2004, **20**:307-315.
 44. Bolstad B: **Low level analysis of high-density oligonucleotide array data: Background, normalization and summarization.** In *PhD thesis University of California, Biostatistics*; 2004.
 45. Smyth GK: **Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments.** *Stat Appl Genet Mol Biol* 2004, **3**:.
 46. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, et al.: **Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics.** *Genome Biol* 2004, **5**:R80.
 47. Ihaka R, Gentleman R: **R: A language for data analysis and graphics.** *Journal of computational and graphical statistics* 1996, **3**:e15.
 48. R: Development core team: **R: A language and environment for statistical computing** Vienna, Austria: R foundation for statistical computing; 2004.
 49. Li C, Wong WH: **Model-based analysis of oligonucleotide arrays: expression index computation and outlier detection.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, **98**:31-36.
 50. Kreuz C, Bartolome Rodriguez MM, Maiwald T, Seidl M, Blum HE, Mohr L, Timmer J: **An error model for protein quantification.** *Bioinformatics* 2007, **23**:2747-2753.
 51. Merglen A, Theander S, Rubi B, Chaffard G, Wollheim CB, Maechler P: **Glucose sensitivity and metabolism-secretion coupling studied during two-year continuous culture in INS-1E insulinoma cells.** *Endocrinology* 2004, **145**:667-678.

Additional files

Additional file 1:

Differentially expressed genes in diabetic rats. 282 genes differentially expressed due to diabetes and grouped according to their function.

Additional file 2:

Differentially expressed genes in diabetic treated rats. 88 genes differentially expressed in diabetic treated animals and grouped according to their function.

Additional file 3:

Description of the specific pancreatic genes differentially expressed due to the treatment in diabetic animals. 28 genes differentially expressed in diabetic treated animals alone with detailed information. These genes were selected from the list of differentially expressed genes in diabetic treated rats [see Additional file [2](#)]. The selection criteria, in order to select those genes only significantly different in the treated diabetic animals, were that they were not present in the list of differentially expressed genes found in diabetic rats and that they presented a fold change higher than 1.25 or lower than -1.25 in the DT group, with respect to the HU group. The microarray expression values of these genes were represented using dChip. Its description includes its name, gene symbol and fold change compared to other experimental groups. The fold change between untreated healthy and untreated diabetic rats is reported in order to show that the differences in the gene's expression between the two groups are minimal. The identification of the genes differentially expressed was performed as described in Additional file [9](#).

Additional file 4:

Genes selected for checking. From the list of all the genes modified by tungstate in the diabetic animals we chose a selection of genes whose function would help us to explain the effects observed in the pancreas of the tungstate-treated diabetic animals. Here we describe why we selected these genes.

Additional file 5:

Affymetrix quality controls of the microarrays. Microarray quality controls according to the supplier.

Additional file 6:

Statistical quality controls of the microarrays. Microarray quality controls using different packages from Bioconductor.

Additional file 7:

Raw and normalized data behaviour. Figures described in the additional file [6](#). Histograms and boxplots of the raw data (A and B) and the background adjusted, normalized and summarized data by RMA (C and D).

Additional file 8:

AffyPLM assessment quality control. Figures described in the additional file [6](#). Boxplots of the normalized unscaled standard errors (NUSE boxplot, A) and boxplots of the distribution of the relative logarithmic expressions (RLE boxplot, B and C [magnificated]).

Additional file 9:

Microarray analysis. Explanation of the microarray analysis to obtain the differential expressed genes from each experimental group.

Additional file 10:

Primers used in the Real Time PCR. Description of the primers used in the Real Time PCR.

Differentially expressed genes in diabetic rats.

Genes up-regulated in STZ-diabetes			
Probe set ID (affymetrix)	Gene name	Symbol	Relative change in diabetes
METABOLISM			
Lipid metabolism			
1370310_at	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2	Hmgcs2	12.03
1367777_at	2,4-dienoyl CoA reductase 1, mitochondrial	Decr1	7.55
1386946_at	carnitine palmitoyltransferase 1a, liver	Cpt1a	4.83
1386885_at	enoyl coenzyme A hydratase 1, peroxisomal	Ech1	3.36
1367735_at	acetyl-Coenzyme A dehydrogenase, long-chain	Acadl	3.06
1370235_at	diazepam binding inhibitor	Dbi	2.56
1370237_at	L-3-hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase, short chain	Hadhsc	2.53
1367694_at	enoyl-Coenzyme A hydratase (trifunctional protein), beta subunit	Hadhb	2.16
1368283_at	enoyl-Coenzyme A, hydratase/3-hydroxyacyl Coenzyme A dehydrogenase	Ehhadh	2.08
1386901_at	similar to fatty acid translocase/CD36	RGD1562323	2.04
1370164_at	enoyl-Coenzyme A hydratase (trifunctional protein), alpha subunit	Hadha	1.96
1369150_at	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4	Pdk4	1.86
1386880_at	acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2 (mitochondrial 3-oxoacyl-Coenzyme A thiolase)	Acaa2	1.73
1367662_at	hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase type II	Hadh2	1.67
1367638_at	malonyl-CoA decarboxylase	Mlycd	1.62
1373921_at	similar to enoyl Coenzyme A hydratase domain containing 3	LOC684538	1.57
1367702_at	acetyl-Coenzyme A dehydrogenase, medium chain	Acadm	1.56
1367767_at	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A lyase	Hmgcl	1.52
1368717_at	fatty acid amide hydrolase	Faah	1.35
Glucose metabolism			
1368622_at	fructose-1,6-bisphosphatase 2	Fbp2	2.63
1368077_at	fructose-1,6-bisphosphatase 1	Fbp1	2.19

Aminoacid metabolism			
1371303_at	L-threonine dehydrogenase	Tdh	17.39
1370200_at	glutamate dehydrogenase 1	Glud1	1.81
Other metabolisms			
1373236_at	phosphopantothenoylcysteine decarboxylase	Ppdc	5.87
1368037_at	carbonyl reductase 1	Cbr1	5.23
1370806_at	all-trans-13,14-dihydroretinol saturase	Retsat	2.36
1371031_at	methionine adenosyltransferase I, alpha	Mat1a	2.28
1370180_at	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 4	Nudt4	1.81
1389587_at	uridine monophosphate synthetase	Umps	1.45
NUCLEAR PROTEINS			
1371521_at	similar to Paired amphipathic helix protein Sin3b (Histone deacetylase complex subunit Sin3b)	LOC683381	2.90
1367847_at	nuclear protein 1	Nupr1	2.70
1371642_at	eukaryotic translation initiation factor 4A2	Eif4a2	1.96
1367798_at	S-adenosylhomocysteine hydrolase	Ahcy	1.94
1374731_at	Coilin	Coil	1.84
1398976_at	nuclear receptor co-repressor 1	Ncor1	1.64
1372242_at	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 3, X-linked	Ddx3x	1.55
1367485_at	transcription elongation factor A (SII) 1	Tcea1	1.54
1398878_at	similar to CPSF4 protein	MGC108785	1.51
1374954_at	histone deacetylase 11	Hdac11	1.50
1370258_at	basic leucine zipper and W2 domains 2	Bzw2	1.42
1373748_at	PDZ domain containing RING finger 3	Pdzrn3	1.39
1389738_at	uracil-DNA glycosylase	Ung	1.38
1388222_at	telomerase reverse transcriptase	Tert	1.38
1390573_a_at	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 4	Nfata4	1.36
1374636_at	PHD finger protein 17	Phf17	1.35
1376023_at	similar to Retinoic acid receptor gamma-A (RAR-gamma-A)	LOC683586	1.30
SIGNALLING			
1387121_a_at	N-myc downstream regulated gene 2	Ndrgr2	2.73
1371817_at	similar to myo-inositol 1-phosphate synthase A1	LOC290651	1.56

PHOSPHATASES			
1392467_at	inositol (myo)-1(or 4)-monophosphatase 2	Impa2	3.45
1370193_at	protein tyrosine phosphatase 4a1	Ptp4a1	2.22
1369961_at	phosphatidic acid phosphatase 2a	Ppap2a	1.62
1373479_at	Protein phosphatase 3, catalytic subunit, alpha isoform	Ppp3ca	1.40
1388502_at	inositol polyphosphate-5-phosphatase B	Inpp5b	1.37
CELL CYCLE / GROWTH			
1371131_a_at	thioredoxin interacting protein	Txnip	5.96
1375420_at	tumor protein p53 inducible protein 11	Tp53i11	3.63
1367830_a_at	tumor protein p53	Tp53	1.71
1388953_at	guanine nucleotide binding protein-like 3 (nucleolar)	Gnl3	1.45
1372052_at	budding uninhibited by benzimidazoles 3 homolog (S. cerevisiae)	Bub3	1.45
1372133_at	related RAS viral (r-ras) oncogene homolog 2	Rras2	1.40
1376195_at	spindlin	Spin	1.36
APOPTOSIS / DEFENSE RESPONSE			
1398326_at	similar to Nur77 downstream protein 2	MGC105647	1.73
1398784_at	complement component 1, q subcomponent binding protein	C1qbp	1.58
1387805_at	BCL2/adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 3	Bnip3	1.40
HORMONES			
1367762_at	somatostatin	Sst	2.54
EXOCRINE ENZYMES			
1371092_at	preprotrypsinogen IV	LOC286960	8.06
MEMBRANE			
1388393_at	proteolipid protein 2	Plp2	1.99
1379429_at	Transmembrane emp24 protein transport domain containing 5	Tmed5	1.56
1375904_at	Transmembrane emp24 protein transport domain containing 5	Tmed5	1.56
1373058_at	transmembrane protein 30A	Tmem30a	1.52
1372369_at	transmembrane protein 109	Tmem109	1.41
1367746_a_at	flotillin 2	Flot2	1.41
STRUCTURAL			

1389533_at	fibulin 2	Fbln2	1.49
MITOCHONDRIA			
1372457_at	mitochondrial tumor suppressor 1	Mtus1	1.78
1389125_at	mitochondrial ribosomal protein L1 (predicted)	Mrpl1_predicted	1.45
ELECTRON TRANSPORT			
1388358_at	electron-transfer-flavoprotein, beta polypeptide	Etfb	1.82
1371253_at	electron transferring flavoprotein, alpha polypeptide	Etfalpha	1.71
1368336_at	ferredoxin 1	Fdx1	1.69
1371519_at	electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase	Etfdh	1.64
1367705_at	glutaredoxin 1 (thioltransferase)	Glrx1	1.39
1370005_at	cytochrome b5 type B	Cyb5b	1.39
OTHERS			
1373898_at	similar to PABP-dependent poly(A) nuclease 3	LOC360760	1.64
1372688_at	exosome component 7	Exosc7	1.33
ESTS			
1390249_at	similar to DKFZP434H132 protein	RGD1305464	7.78
1372372_at	similar to Ab2-225	RGD1306952	2.38
1399001_at	hypothetical LOC294030	RGD1305481	2.26
1373778_at	Transcribed locus		2.07
1374816_at	similar to hypothetical protein FLJ30973	LOC363091	1.92
1377460_at	EST		1.89
1371445_at	leucine rich repeat containing 59	Lrrc59	1.70
1371976_at	hypothetical protein LOC682248	LOC682248	1.68
1371854_at	EST		1.65
1367494_at	similar to CGI-35 protein (predicted)	RGD1310899_predicted	1.56
1372027_at	Transcribed locus		1.54
1372843_at	LOC363020 (predicted)	RGD1309410_predicted	1.52
1374194_at	EST		1.50
1375934_at	similar to RIKEN cDNA D330045A20 (predicted)	RGD1566282_predicted	1.50
1371856_at	CDNA clone MGC:93828 IMAGE:7110880		1.50
1388739_at	similar to chromosome 14 open reading frame 130	RGD1359144	1.48

1388887_at	Transcribed locus		1.47
1371631_at	similar to 2010003J03Rik protein	RGD1304686	1.45
1376034_at	similar to mKIAA0738 protein (predicted)	RGD1565474_predicted	1.44
1373497_at	Transcribed locus		1.43
1373033_at	similar to chromosome 6 open reading frame 83; similar to RIKEN cDNA 5630401J11	MGC105508	1.43
1373334_at	similar to RIKEN cDNA 0610039G24 gene (predicted)	RGD1310828_predicted	1.43
1388579_at	similar to alternative testis transcripts open reading frame A CG4241-PA, isoform A	LOC684597	1.42
1385866_at	Transcribed locus		1.42
1373922_at	Transcribed locus		1.41
1390288_at	EST		1.36
1374090_at	similar to DKFZP547E1010 protein	LOC361990	1.35

Genes down-regulated in STZ-diabetes			
Probe set ID (affymetrix)	Gene name	Symbol	Relative change in diabetes
METABOLISM			
Lipid metabolism			
1367887_at	lecithin cholesterol acyltransferase	Lcat	-4.09
1368453_at	fatty acid desaturase 2	Fads2	-1.81
1388148_a_at	low density lipoprotein receptor-related protein associated protein 1	Lrpap1	-1.76
1388190_at	apolipoprotein B	Apob	-1.72
1373053_at	Similar to Acyl-CoA-binding protein (ACBP)		-1.71
1368016_at	peroxisomal trans-2-enoyl-CoA reductase	Pecr	-1.46
1372443_at	low density lipoprotein receptor-related protein 11	Lrp11	-1.40
Aminoacid metabolism			
1387034_at	phenylalanine hydroxylase	Pah	-1.83

1372741_at	saccharopine dehydrogenase (putative)	Sccpdh	-1.34
Other metabolisms			
1387022_at	aldehyde dehydrogenase family 1, member A1	Aldh1a1	-2.44
1367999_at	aldehyde dehydrogenase 2	Aldh2	-1.53
1373222_at	hexosaminidase A	Hexa	-1.53
1387339_at	selenoprotein P, plasma, 1	Sepp1	-1.45
1369863_at	alcohol dehydrogenase 4 (class II), pi polypeptide	Adh4	-1.35
1388330_at	vitamin K epoxide reductase complex, subunit 1	Vkorc1	-1.35
NUCLEAR PROTEINS			
1371959_at	histone cluster 2, H2aa	Hist2h2aa	-3.72
1373860_at	SRY-box containing gene 4	Sox4	-2.03
1390021_at	histone cluster 1, H2bh	Hist1h2bh	-1.91
1368376_at	nuclear receptor subfamily 0, group B, member 2	Nr0b2	-1.74
1374600_at	histone cluster 1, H4b	Hist1h4b	-1.66
1383065_at	nicotin 1	Nicn1	-1.42
1387278_at	peroxisome proliferator activated receptor alpha	Ppara	-1.40
1370386_at	RuvB-like protein 1	Ruvbl1	-1.39
1369085_s_at	small nuclear ribonucleoprotein N	Snrpn	-1.38
1369728_at	similar to germinal histone H4 gene	LOC680097	-1.30
SIGNALLING			
1398296_at	membrane interacting protein of RGS16	Mir16	-2.97
1370150_a_at	thyroid hormone responsive protein	Thrsp	-2.77
1387671_at	secretin receptor	Sctr	-2.10
1368884_at	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	Entpd1	-1.70
1370842_at	branched chain ketoacid dehydrogenase kinase	Bckdk	-1.70
1368523_at	Ca2+-dependent secretion activator	Cadps	-1.68
1367905_at	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3	Enpp3	-1.64
1370948_a_at	myristoylated alanine rich protein kinase C substrate	LOC294446	-1.60
1369855_at	histamine receptor H 1	Hrh1	-1.58
1398298_at	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1D	Htr1d	-1.54
1371158_at	Eph receptor A8	Epha8	-1.49

1375566_at	angiotensin II, type I receptor-associated protein	Agtrap	-1.46
1373365_at	cytidylate kinase	Cmpk	-1.46
1369230_at	gamma-aminobutyric acid (GABA-C) receptor, subunit rho 2	Gabbr2	-1.43
PROTEIN MODIFICATION AND DEGRADATION			
1369286_at	protein C	Proc	-2.46
1388699_at	mannosidase 2, alpha B1	Man2b1	-2.39
1371615_at	diacylglycerol O-acyltransferase homolog 2 (mouse)	Dgat2	-2.39
1372421_at	aspartylglucosaminidase	Aga	-2.05
1387131_at	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade I, member 1	Serpini1	-2.03
1376249_at	fucosidase, alpha-L-2, plasma	Fuca2	-1.96
1367835_at	proprotein convertase subtilisin/kexin type 1 inhibitor	Pcsk1n	-1.85
1392798_at	protein disulfide isomerase associated 2	Pdia2	-1.78
1387155_at	proprotein convertase subtilisin/kexin type 2	Pcsk2	-1.74
1372706_at	hexosaminidase B	Hexb	-1.72
1386938_at	alanyl (membrane) aminopeptidase	Anpep	-1.71
1374790_at	N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase, gamma subunit	Gnptg	-1.68
1371358_at	glycoprotein, synaptic 2	Gpsn2	-1.67
1372504_at	similar to dolichyl-phosphate mannosyltransferase polypeptide 3 (Dolichol-phosphate mannose synthase subunit 3)	LOC684429	-1.57
1388643_at	fucosyltransferase 8 (alpha (1,6) fucosyltransferase)	Fut8	-1.39
1391272_at	similar to WAP four-disulfide core 6-like 1	LOC684696	-1.36
1389833_at	Sulfatase modifying factor 1	Sumf1	-1.34
1368281_at	dipeptidase 1 (renal)	Dpep1	-1.34
TRANSPORT / TRAFFICKING			
1368044_at	secretogranin 2	Scg2	-6.95
1387228_at	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 2	Slc2a2	-3.68
1368316_at	aquaporin 8	Aqp8	-2.90
1369999_a_at	neuronatin	Nnat	-2.13
1369769_at	potassium voltage-gated channel, Isk-related subfamily, member 1	Kcne1	-1.84
1374427_at	Synaptotagmin XIII	Syt13	-1.57
1367877_at	solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 2	Slc11a2	-1.49
1376413_at	Amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family A, member 1	Apba1	-1.43

1371889_at	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 17		Slc22a17	-1.37
1368343_at	potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 2		Kcnh2	-1.36
OXIDATIVE STRESS				
1367917_at	cytochrome P450, family 2, subfamily d, polypeptide 26		Cyp2d26	-2.49
1368023_at	quiescin Q6		Qscn6	-2.18
1388122_at	glutathione-S-transferase, pi 1 /// glutathione S-transferase, pi 2		Gstp1 /// Gstp2	-1.96
1386940_at	tissue inhibitor of metalloproteinase 2		Timp2	-1.90
1368514_at	monoamine oxidase B		Maob	-1.72
1373043_at	stromal cell-derived factor 2-like 1 (predicted)		Sdf2l1	-1.70
1375357_at	dystonia 1		Dyt1	-1.51
1368265_at	cytochrome P450 monooxygenase CYP2T1		Cyp2t1	-1.49
1371249_at	X-box binding protein 1		Xbp1	-1.48
1387305_s_at	cytochrome P450, family 11, subfamily B, polypeptide 2 /// cytochrome P450, subfamily 11B, polypeptide 1		Cyp11b1 /// Cyp11b2	-1.34
PHOSPHATASES				
1386968_at	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1A		Ppp1r1a	-1.86
1370182_at	protein tyrosine phosphatase, receptor type, N polypeptide 2		Ptpm2	-1.40
1388805_at	Protein phosphatase 2 (formerly 2A), catalytic subunit, alpha isoform		Ppp2ca	-1.40
1388048_a_at	inositol polyphosphate-4-phosphatase, type II		Inpp4b	-1.29
CELL CYCLE / GROWTH				
1376073_at	Sel1 (suppressor of lin-12) 1 homolog		Sel1h	-2.06
1374357_at	CDC91 cell division cycle 91-like 1		Cdc91l1	-1.37
APOPTOSIS / DEFENSE RESPONSE				
1370027_a_at	alpha-1-inhibitor III		LOC297568	-9.05
1388229_a_at	Murine globulin 1 homolog (mouse)		Mug1	-4.45
1369953_a_at	CD24 antigen		Cd24	-2.83
1389762_at	similar to Fc fragment of IgG binding protein		RGD1311906	-2.37
1370243_a_at	prothymosin alpha		Ptma	-1.69
1369879_a_at	testis enhanced gene transcript		Tegt	-1.63
HORMONES				
1370077_at	insulin 2		Ins2	-25.73

1387815_at	insulin 1		Ins1	-7.72
1387660_at	islet amyloid polypeptide		Iapp	-4.39
1367904_at	regulated endocrine-specific protein 18		Resp18	-2.17
1368312_at	oxytocin		Oxt	-1.52
EXOCRINE ENZYMES				
1370359_at	amylase 1, salivary		Amy1	-68.66
1369503_at	amylase 2, pancreatic		Amy2	-29.37
1390326_at	angiogenin, ribonuclease A family, member 1		Ang1	-2.89
1386921_at	carboxypeptidase E		Cpe	-3.78
1387503_at	carboxypeptidase N, polypeptide 1, 50kD		Cpn1	-1.41
MEMBRANE				
1398325_at	tetraspanin 3		Tspan3	-2.25
1387135_at	a disintegrin and metallopeptidase domain 15 (metargidin)		Adam15	-1.58
1372780_at	transmembrane protein 53		Tmem53	-1.37
MITOCHONDRIA				
1375788_at	Ribosomal protein L7		Rpl7	-2.37
1398946_at	similar to mitochondrial ribosomal protein S16		LOC683012	-1.44
STRUCTURAL				
1368113_at	trefoil factor 2 (spasmolytic protein 1)		Tff2	-40.39
1388793_at	phosphatidylinositol glycan, class Q		Pigq	-1.54
1374399_at	EH-domain containing 4		Ehd4	-1.50
1387844_at	LIM and SH3 protein 1		Lasp1	-1.42
1368367_at	CUB and zona pellucida-like domains 1		Cuzd1	-1.42
OTHERS				
1388723_at	brain and reproductive organ-expressed protein		Bre	-1.55
1378983_at	Similar to translin-associated factor X (Tsnax) interacting protein 1		RGD1565341	-1.49
1373438_at	ubiquitin-conjugating enzyme E2O		Ube2o	-1.44
1374287_at	paladin		Palad	-1.40
ESTS				
1388985_at	Transcribed locus, moderately similar to NP_001020173.1 protein LOC310926			-3.97

Differentially expressed genes in diabetic treated rats.

Genes up-regulated in treated diabetic rats				
Probe set ID (affymetrix)	Gene name	Symbol	Relative change	
			DT vs DU	DT vs H
METABOLISM				
Aminoacid metabolism				
1389785_at	aspartoacylase (aminoacylase) 3	Acy3	1.91	1.81
1387034_at	phenylalanine hydroxylase	Pah	1.90	1.04
1368344_at	glutamic acid decarboxylase 1	Gad1	1.80	1.32
1377375_at	aminoadipate-semialdehyde synthase	Aass	1.52	-1.01
Other metabolisms				
1371774_at	spermidine/spermine N1-acetyl transferase	Sat	2.88	2.86
NUCLEAR PROTEINS				
1371959_at	histone cluster 2, H2aa	Hist2h2aa	2.41	-1.55
1368376_at	nuclear receptor subfamily 0, group B, member 2	Nr0b2	1.81	1.04
1374600_at	histone cluster 1, H4b	Hist1h4b	1.55	-1.07
SIGNALLING				
1379281_at	uterine sensitization-associated protein-1	Usag-1	2.17	1.45
1367905_at	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3	Enpp3	1.73	1.06
1398298_at	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1D	Htr1d	1.61	1.05
1368705_at	endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 8	Edg8	1.50	1.28
PROTEIN MODIFICATION AND DEGRADATION				
1373381_at	hect domain and RLD 4	Herc4	6.45	4.02
1386938_at	alanyl (membrane) aminopeptidase	Anpep	2.96	1.73
1388680_at	C1GALT1-specific chaperone 1	C1galt1c1	1.74	1.33
1368281_at	dipeptidase 1 (renal)	Dpep1	1.59	1.19
1368131_at	calpain 6	Capn6	1.56	1.26
1369286_at	protein C	Proc	1.42	-1.73
1368430_at	legumain	Lgmn	1.40	1.53

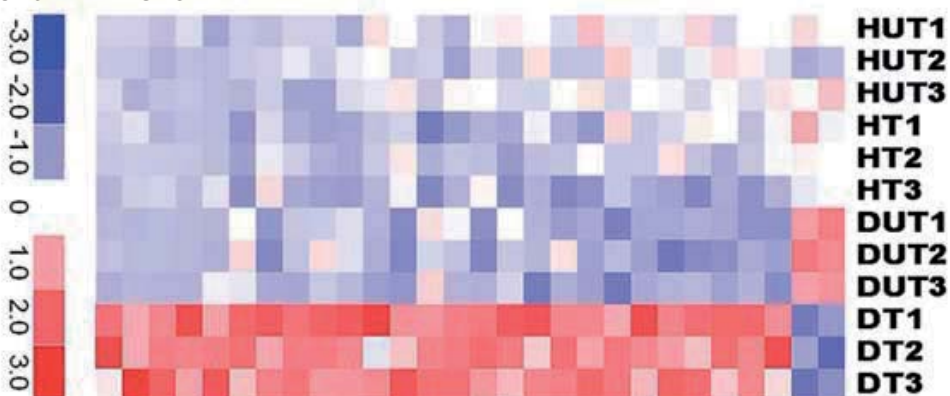
TRANSPORT / TRAFFICKING			
1368316_at	aquaporin 8	Aqp8	2.27 -1.28
1376709_at	solute carrier family 39 (metal ion transporter), member 8	Slc39a8	1.80 1.40
1369769_at	potassium voltage-gated channel, Isk-related subfamily, member 1	Kcne1	1.66 -1.11
1372710_at	blocked early in transport 1 homolog (S. cerevisiae)	Bet1	1.41 1.35
1388163_at	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 5	Slc25a5	1.40 1.39
OXIDATIVE STRESS			
1367917_at	cytochrome P450, family 2, subfamily d, polypeptide 26	Cyp2d26	2.63 1.06
1368023_at	quiescin Q6	Qscn6	1.94 -1.12
1388122_at	glutathione-S-transferase, pi 1 /// glutathione S-transferase, pi 2	Gstp1 /// Gstp2	1.90 -1.03
1371249_at	X-box binding protein 1	Xbp1	1.75 1.18
1398857_at	surfeit 1	Surf1	1.49 1.04
CELL CYCLE / GROWTH			
1367859_at	transforming growth factor, beta 3	Tgfb3	2.37 1.82
1369953_a_at	CD24 antigen	Cd24	2.37 -1.19
1376073_at	Sel1 (suppressor of lin-12) 1 homolog	Sel1h	2.24 1.09
1368114_at	fibroblast growth factor 13	Fgf13	2.23 1.49
1373043_at	stromal cell-derived factor 2-like 1	Sdf2l1	1.98 1.17
1371360_at	N-myc downstream regulated gene 1	Ndrgr1	1.52 1.29
APOPTOSIS / DEFENSE RESPONSE			
1370243_a_at	prothymosin alpha	Ptma	1.39 -1.21
MEMBRANE			
1368052_at	tetraspanin 8	Tspan8	2.78 2.41
1388545_at	SPARC-related modular calcium binding protein 1	Smoc1	2.02 2.24
EXOCRINE ENZYMES			
1369503_at	amylase 2, pancreatic	Amy2	26.21 -1.12
1370359_at	amylase 1, salivary	Amy1	15.67 -4.38
1390326_at	angiogenin, ribonuclease A family, member 1	Ang1	2.39 -1.21
1368943_at	ribonuclease, RNase A family 4	Rnase4	1.83 1.38
1370880_at	ribonuclease/angiogenin inhibitor 1	Rnh1	1.32 1.14

STRUCTURAL			
1368113_at	trefoil factor 2 (spasmolytic protein 1)	Tff2	30.67
1368367_at	CUB and zona pellucida-like domains 1	Cuzd1	1.70
1368099_at	CLIP associating protein 2	Clasp2	1.40
OTHERS			
1389654_at	Plastin 1	Pls1_predicted	1.58
ESTS			
1375052_at	similar to nuclear localized factor 2	LOC501015	3.97
1389762_at	similar to Fc fragment of IgG binding protein	RGD1311906	2.56
1383606_at	membrane targeting (tandem) C2 domain containing 1	Mtac2d1	1.56
1374349_at	CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase-like	Ctdspl_predicted	1.54
1388900_at	RGD1566118 (predicted)	RGD1566118_predicted	1.54
1389732_at	Similar to CG4025-PA	LOC679937	1.49
1373705_at	similar to 39S ribosomal protein L28, mitochondrial precursor (L28mt) (MRP-L28)	LOC497876	1.40
1372642_at	Transcribed locus		1.28
			1.44

Genes down-regulated in treated diabetic rats				
Probe set ID(affymetrix)	Gene name	Symbol	Relative change	
			DT vs DU	DT vs HU
METABOLISM				
Lipid metabolism				
1370310_at	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2	Hmgcs2	-11.81	1.02
1367777_at	2,4-dienoyl CoA reductase 1, mitochondrial	Decr1	-4.96	1.52
1386885_at	enoyl coenzyme A hydratase 1, peroxisomal	Ech1	-3.35	1.00
1370237_at	L-3-hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase, short chain	Hadhsc	-2.72	-1.08
1367735_at	acetyl-Coenzyme A dehydrogenase, long-chain	Acadl	-2.44	1.25

1386901_at	similar to fatty acid translocase/CD36	RGD1562323	-2.14	-1.05
1367694_at	hydroxyl-Coenzyme A dehydrogenase	Hadhb	-1.96	1.10
1368283_at	enoyl-Coenzyme A, hydratase/3-hydroxyacyl Coenzyme A dehydrogenase	Ehhadh	-1.85	1.13
Glucose metabolism				
1368622_at	fructose-1,6-bisphosphatase 2	Fbp2	-2.75	-1.04
1368077_at	fructose-1,6-bisphosphatase 1	Fbp1	-2.07	1.06
Aminoacid metabolism				
1371303_at	L-threonine dehydrogenase	Tdh	-31.68	-1.82
Other metabolisms				
1373236_at	phosphopantothenoylcysteine decarboxylase	Ppcdc	-6.32	-1.08
1368037_at	carbonyl reductase 1	Cbr1	-4.52	1.16
1370806_at	all-trans-13,14-dihydroretinol saturase	Retsat	-2.98	-1.27
NUCLEAR PROTEINS				
1371521_at	similar to Paired amphipathic helix protein Sin3b (Histone deacetylase complex subunit Sin3b)	LOC683381	-2.25	1.29
SIGNALLING				
1389420_at	signal-transducing adaptor protein-2	Stap2	-1.39	1.06
PROTEIN MODIFICATION AND DEGRADATION				
1388924_at	angiopoietin-like 4	Angptl4	-3.37	-1.06
1372536_at	chaperone, ABC1 activity of bc1 complex like	Cabc1	-2.06	-1.15
TRANSPORT / TRAFFICKING				
1368418_a_at	ceruloplasmin	Cp	-1.42	1.17
OXIDATIVE STRESS				
1389253_at	vanin 1	Vnn1	-2.30	-1.18
1371942_at	similar to Glutathione S-transferase, theta 3	RGD1562732	-2.15	-1.05
PHOSPHATASES				
1392467_at	inositol (myo)-1(or 4)-monophosphatase 2	Impa2	-3.21	1.07
CELL CYCLE / GROWTH				
1371131_a_at	thioredoxin interacting protein	Txnip	-4.56	1.31
1386891_at	Raf kinase inhibitory protein	Rkip	-1.59	-1.29

OTHERS				
Accession	Description	Gene	Score	Value
1368000_at	complement component 3	C3	-1.32	1.00
ESTS				
1390249_at	similar to DKFZP434H132 protein	RGD1305464	-5.57	1.40
1372372_at	similar to Ab2-225	RGD1306952	-3.40	-1.43
1377460_at	EST		-1.88	1.01
1371922_at	Transcribed locus		-1.54	-1.25
1373898_at	similar to PABP-dependent poly(A) nuclease 3	LOC360760	-1.42	1.16
1373117_at	ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains 2 (predicted)	Uhrf2_predicted	-1.36	-1.06
1377208_at	Transcribed locus		-1.35	-1.07
1376931_at	similar to Hepatocellular carcinoma-associated antigen 58 homolog (predicted)	RGD1305020_predicted	-1.32	-1.07



Gene	Gene Symbol	Fold change		
		DU vs HU	DT vs DU	DT vs HU
Raf kinase inhibitory protein	Rkip	1.23	-1.59	-1.29
Transcribed locus		1.23	-1.54	-1.25
calpain 6	Capn6	-1.24	1.56	1.26
endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 8	Edg8	-1.17	1.50	1.28
Plastin 1 (I isoform) (predicted)	Pls1 predicted	-1.22	1.58	1.29
RGD1566118 (predicted)	RGD1566118 predicted	-1.19	1.54	1.29
N-myc downstream regulated gene 1	Ndrg1	-1.17	1.52	1.29
CTD small phosphatase-like	Ctdspl predicted	-1.17	1.54	1.32
glutamic acid decarboxylase 1	Gad1	-1.36	1.80	1.32
C1GALT1-specific chaperone 1	C1galt1c1	-1.31	1.74	1.33
blocked early in transport 1 homolog	Bet1	-1.04	1.41	1.35
ribonuclease, RNase A family 4	Rnase4	-1.32	1.83	1.38
solute carrier family 25, member 5	Slc25a5	-1.01	1.40	1.39
solute carrier family 39, member 8	Slc39a8	-1.28	1.80	1.40
CLIP associating protein 2	Clasp2	1.02	1.40	1.43
Transcribed locus		1.13	1.28	1.44
uterine sensitization-associated protein-1	Usaq1	-1.50	2.17	1.45
fibroblast growth factor 13	Fgf13	-1.49	2.23	1.49
Similar to CG4025-PA	LOC679937	1.01	1.49	1.51
legumain	Lgmn	1.09	1.40	1.53
aspartoacylase (aminoacylase) 3	Acy3	-1.05	1.91	1.81
transforming growth factor, beta 3	Tgfb3	-1.30	2.37	1.82
membrane targeting (tandem) C2 domain containing 1	Mtacc2d1	1.31	1.56	2.05
SPARC-related modular calcium binding protein 1	Smoc1	1.11	2.02	2.24
tetraspanin 8	Tspan8	-1.15	2.78	2.41
spermidine/spermine N1-acetyl transferase	Sat	-1.01	2.88	2.86
similar to nuclear localized factor 2	LOC501015	-1.12	3.97	3.54
hect domain and RLD 4	Herc4	-1.61	6.45	4.02

Genes selected for checking.

	Why these genes are selected?	Pathway	References
Rkip	<ul style="list-style-type: none"> In the pancreas, localizes specifically in the islets Controls beta cell proliferation RKIP binds to Raf-1, leading to the blockage of Mek and Erk activation Tungstate activates the classical MAPK pathway (Ras->Raf->Mek->Erk) in hepatocytes 	MAPK p42/44	<ul style="list-style-type: none"> Surgery 136:708-715 J Biol Chem 278:42785-42794
Fgf13	<ul style="list-style-type: none"> Fgf13 binds to islet-brain 2, recruiting p38δ, and increasing the activity of this kinase Tungstate increases the phosphorylation of p38 in the islets of nSTZ-rats 	MAPK p38	<ul style="list-style-type: none"> J Biol Chem 277:49111-49119 Diabetologia 47:470- 477
Tspn8	<ul style="list-style-type: none"> Tetraspanin 8 may exert tumor-promoting activities through an increase in cell motility and by inducing angiogenesis STZ damage provokes a reduction in islet capillary area and severe microcirculatory disturbances within pancreatic islets 		<ul style="list-style-type: none"> Am J Physiol 273:E376-E382 Cancer Res 66:7083-7094
Usag-1	<ul style="list-style-type: none"> Inhibits or increases Wnt signaling depending on the context and inhibits BMP signaling Controls the cell fate of cells in the kidney, tooth and hair Wnt and BMP signaling have been demonstrated to be essential for the development and regeneration of the pancreas 	Wnt BMP	<ul style="list-style-type: none"> Development. 130:4295-305 Cytokine Growth Factor Rev. 16:309-17 Kidney Int. 73:181-91 Science. 309:2067-70 Proc Natl Acad Sci U S A. 102:14653-8 Proc Natl Acad Sci U S A. 104:6247-52 BMC Dev Biol. 7:4 Gastroenterology. 134:544-55 J Cell Sci. 115:753-60
Tgfb3	<ul style="list-style-type: none"> Controls epithelial mesenchymal transformation, mesenchymal proliferation and angiogenesis during mouse palate development Regulates neuron differentiation and blood-testis barrier dynamics through the Sertoli junctions Other members of the TGF family have biological activities that also control adhesion, proliferation, and differentiation, which are important processes for pancreas regeneration 	Tgf-beta	<ul style="list-style-type: none"> Plast Reconstr Surg 108:938-948 J Cell Biol. 163:1291-301 Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 73:956-65 Stem Cells. 24:2120-9 Biol Reprod. 68:1597-612 Annu Rev Biochem. 67:753-91 Science 306:2261-2264 Mol. Endocrinol 21:1467-477
Xbp1	<ul style="list-style-type: none"> Key role in the unfolded protein response Xbp1 knockout animals display abnormalities exclusively in secretory organs such as exocrine pancreas which lead to early postnatal lethality 	UPR (Unfolding protein response)	<ul style="list-style-type: none"> Mol Cell Biol 23:7448-7459 EMBO J 24:4368-80
Sellh	<ul style="list-style-type: none"> Present in the acini and the islet in the pancreas Implicated in beta-cell growth Inhibits Notch pathway Can modulate the TGFbeta pathway Both pathways, TGFbeta and Notch pathway, can control the cell fate and are essential for the pancreas development 	UPR (Unfolding protein response) Notch Tgf-beta	<ul style="list-style-type: none"> Oncogene 22:6359-68 DNA Cell Biol. 23:510-518 FEBS Lett. 581:5355-60 Res Commun Mol Pathol Pharmacol. 102:265-72 Am J Pathol 169:1206-1214

Affymetrix quality controls

Our arrays were submitted to the quality controls established by Affymetrix [1]. These results were obtained through the examination of the .dat and .rpt files, which were done by the software provided by Affymetrix MAS 5.0.

1.- Probe Array Image Inspection

A general visual inspection of the different arrays (.dat files) was done without observing any evident problems (scratches, saturation areas, etc.).

2.- B2 Oligo Performance

The pattern of intensities (border and corner pattern and the array name) done by B2 Oligo was observed clearly in the arrays.

3.- Average Background and Noise Values

The Average Background and Noise (RawQ) was similar among the arrays, ranged between 2.13 and 3.15 and with a median of 2.54.

4.- Hybridization Controls: bioB, bioC, bioD and cre.

All hybridization controls were called “Present” and bioB, bioC, bioD and cre have respectively increasing signal values.

5.- Internal Control Genes: GAPDH and β -actin.

The ratio of the 3' to the 5' GAPDH and β -actin probe set was always no more than 3. GAPDH: range between 1.04 and 1.62 with a median of 1.435. β -actin: range between 0.94 and 1.93 with a median of 1.315.

6.- Percent Present

The percentage of genes called Present remained consistent across the arrays, being into the range of 29.2 and 34.9 with a median of 31.9.

7.- Scaling and Normalization Factors

Applying a global scaling with a Target Intensity value of 150 the scaling factor was similar among all the arrays, ranged between 1.257 and 2.705 and with a median of 2.090.

Therefore, we could conclude that arrays had passed all the Affymetrix quality controls.

1. Affymetrix, Inc. “GeneChip® Expression Analysis Data Analysis Fundamentals”. Available from https://www.affymetrix.com/support/downloads/manuals/data_analysis_fundamentals_manual.pdf, accessed 16 January 2008.

Statistical Quality Control

Histogram and box plot analysis of the raw data were performed with Affy package [1] [see Additional file 7 A and B], observing that all the arrays had a similar range of intensities and there was not signal saturation at the highest intensities. By plotting the histograms and the boxplots of the background adjusted, normalized and summarized raw data by Robust Multi-array Analysis (RMA) [2] [see Additional file 7 C and D], we could conclude that this transformation overcame the subtle differences between the arrays.

Furthermore, the arrays passed the outlier detection algorithm described by Li And Wong [3], which was applied when the model-based expression measures were calculated by the PM only and the PM/MM model.

Moreover, we fitted to the raw data a robust linear model by iteratively reweighted least squares, with the parameters probes and samples. Chip image plots of the weights from the robust linear model fit were drawn (data not show), without detecting any evident problem. Additionally, boxplots of the normalized unscaled standard errors (NUSE boxplot, [see Additional file 8 A]) and boxplots of the distribution of the relative logarithmic expressions (RLE boxplot, [see Additional file 8 B and C]) were plotted, observing a similar tendency in all the arrays (the boxes were in a similar range). These observations were done using the AffyPLM package [4].

Therefore, we concluded that there wasn't any outlier among the arrays.

Versions used

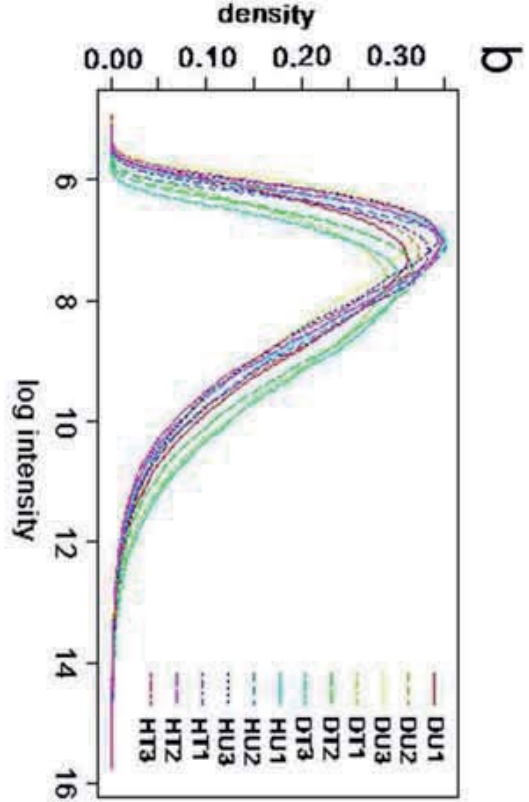
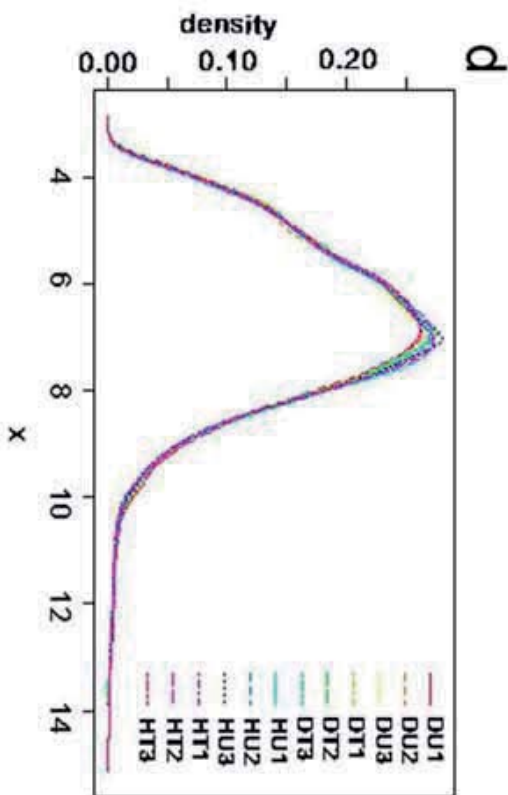
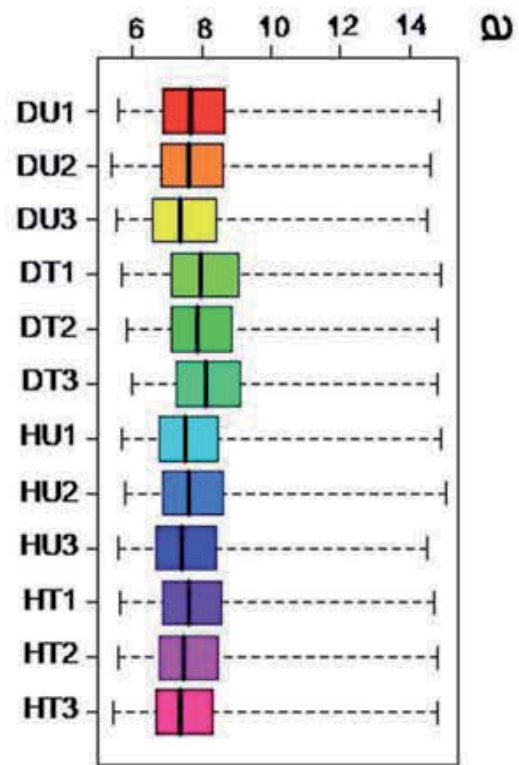
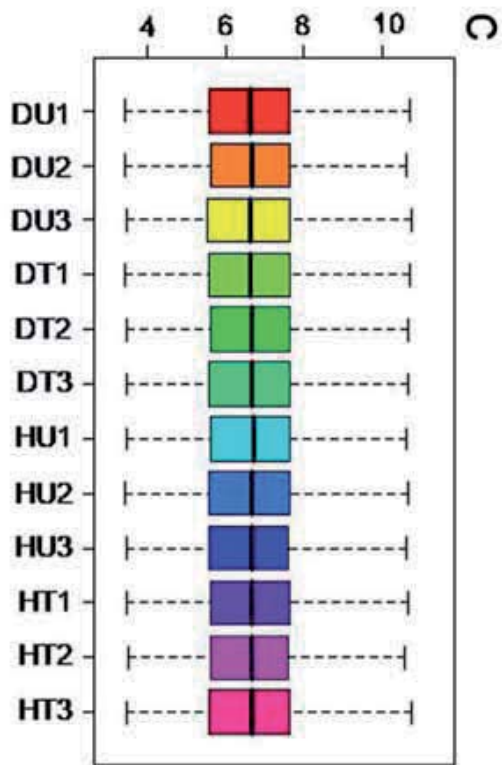
Affy package (version 1.6.7) and AffyPLM package (version 1.3.3) from Bioconductor [5] were performed on R language [6,7] (version 2.1.0).

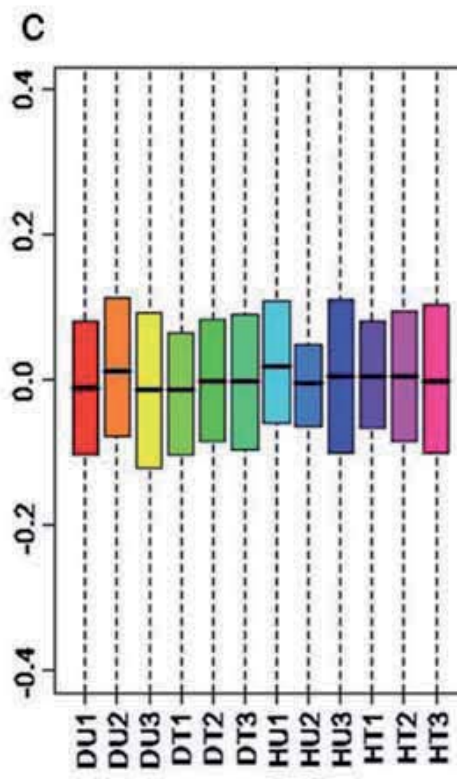
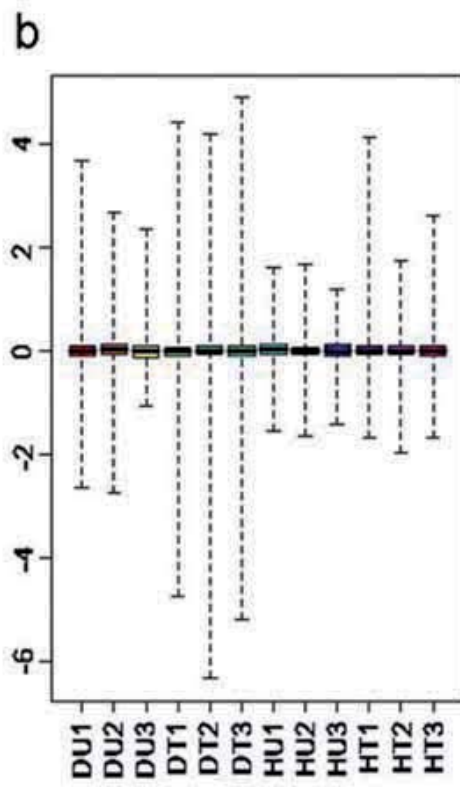
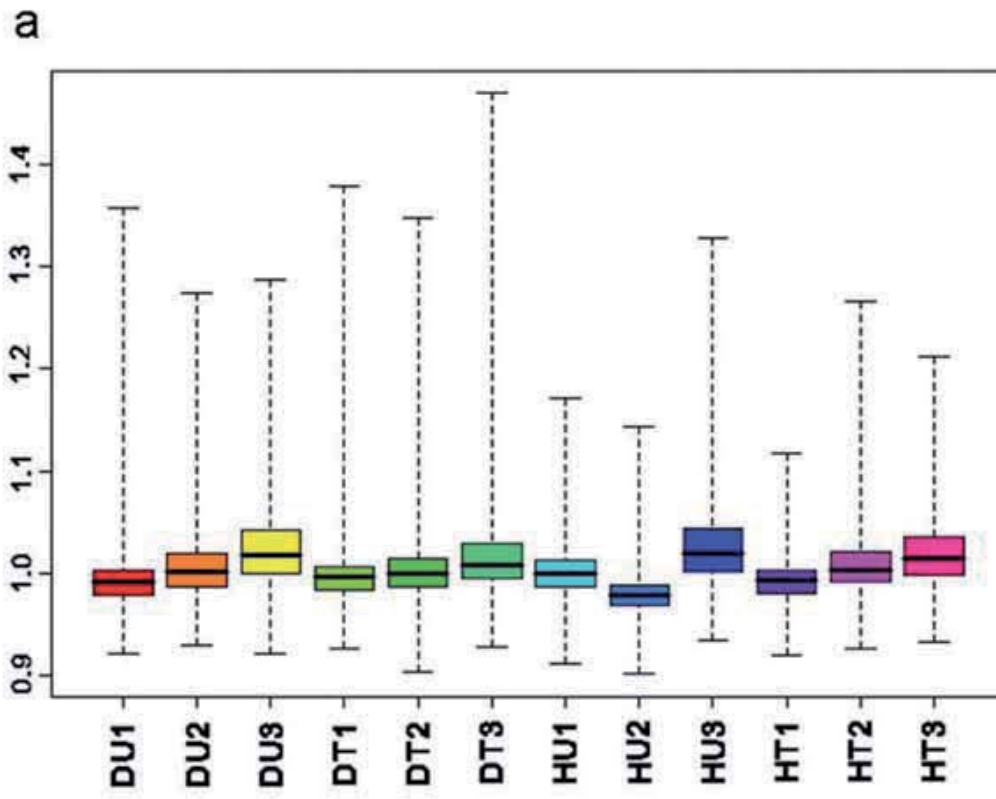
The outlier detection algorithm described by Li and Wong were performed with dChip (version Jun 2 2005).

All the scripts are available under request.

1. Gautier L, Cope L, Bolstad BM, Irizarry RA. affy--analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics* 2004; **20**:307-15.
2. Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res* 2003; **31**:e15.

3. Li C, Wong WH. Model-based analysis of oligonucleotide arrays: expression index computation and outlier detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**:31-6. Available from <http://www.dchip.org>, accessed 16 January 2008.
4. Bolstad, BM. *Low level analysis of high-density oligonucleotide array data: Background, normalization and summarization. Dissertation.* University of California, Berkeley; 2004.
5. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, *et al.* Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* 2004; **5**: R80. Available from <http://www.bioconductor.org>, accessed 16 January 2008.
6. Ihaka R and Gentleman R. R: A language for data analysis and graphics. *Journal of computational and graphical statistics* 1996; **3**: e15.
7. R: Development core team. *R: A language and environment for statistical computing.* R foundation for statistical computing. Viena, Austria; 2004. Available from <http://www.r-project.org>, accessed 16 January 2008.





Microarray analysis

Background adjustment, normalization and data summarization were performed by evaluation of .cel files by Robust Multi-array Analysis (RMA) [1] using the Affy package [2]. Processed data was analyzed with the LIMMA package [3]. The selection of differentially expressed genes between conditions was based on a linear model $Y_{ijk} = \mu_g + \text{Treatment}_{ig} + \text{Diabetes}_{jg} + (\text{Diabetes and Treatment})_{ijg} + \varepsilon_{ijk}$ with empirical Bayes moderation of the variance estimates following the methodology developed by Smyth [3]. The method extends traditional linear model analysis using empirical Bayes methods to combine information from the whole array and every individual gene in order to obtain improved error estimates. This method also provides the "B-statistic" which is defined as the logarithm of the posterior odds that a gene is differentially expressed vs that it is not. This statistic has been used to select genes by calling differentially expressed those genes whose B-value is greater than zero, that is, those genes where it is more likely that they are differentially expressed than they are not. With the differentially expressed genes, the genes and the samples were clustered and represented in a heat diagram with the dChip software [4].

1. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, *et al.* Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 2003; **4**: 249-64.
2. Gautier L, Cope L, Bolstad BM, Irizarry RA. affy--analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics* 2004; **20**: 307-15.
3. Smyth, G. K. Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology* 2004; **3**, No. 1, Article 3;
4. Li C, Wong WH. Model-based analysis of oligonucleotide arrays: expression index computation and outlier detection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; **98**: 31-6. [<http://www.dchip.org>]

Primers used in the Real Time PCR.

Tbp (NM_001004198)

Forward: tgcacaggagccaagagtga

Reverse: agcccagcttctgcacaact

Tgfb3 (NM_013174)

Forward: caggcccttgcccttacc

Reverse: tcaggggtgttatagtccaagca

Fgf13 (NM_053428)

Forward: tctcccgatccggaagtg

Reverse: ggattgcctccattcagtacac

Xbp1 (NM_001004210)

Forward: tcctgggaggacactttgc

Reverse: tgggggtggctttagacact

Usag-1 (NM_153737)

Forward: agcccgggtggcattttc

Reverse: gctggcattccactccaaga

Tspan8 (NM_133526)

Forward: tgcagttgggtccatcatca

Reverse: agcatgcagcgactttcttc

Sel1h (NM_177933)

Forward: ttgatgtagggctctggatgg

Reverse: tctaagcagcttctgggattcaac

Rkip (NM_017236)

Forward: acttctggtggtcaacatgaa

Reverse: tccggagcccacgtattc

Insulin2 (NM_019130)

Forward: ttgtggttctcactgggtggaa

Reverse: cactgtgggtcctccacttc

Amylase (NM_031502)

Forward: cattttccaagaggtcattgatctt

Reverse: tcacgcgccatttcc

Nupr1 (NM_053611)

Forward: gcctggcgctgagacaga

Reverse: ccaaggtcctgtatccattgct

Por razones de Copyright, la versión completa del artículo (Altirriba J, Gasa R, Casas S, Ramírez-Bajo MJ, Ros S, Gutierrez-Dalmau A, Ruiz de Villa MC, Barbera A, Gomis R. The role of transmembrane protein 27 (TMEM27) in islet physiology and its potential use as a beta cell mass biomarker. *Diabetologia*. 2010 Jul;53(7):1406-14) ha sido retirada de la versión on-line de esta tesis doctoral. El artículo completo puede ser obtenido a través de la página web de la revista *Diabetología*: www.diabetologia-journal.org

