

Efecto de la hiperactividad de la cdk4 en la fisiología del islote pancreático y en el desarrollo de la diabetes autoinmune

Tesis doctoral presentada por
NÚRIA MARZO ADAM
para optar al grado de Doctora en Bioquímica
Laboratorio Experimental de Diabetes. IDIBAPS

Directores :
Dra. Concepció Mora Giral
Dr. Ramon Gomis de Barbarà

Programa de doctorado Biología y Patología Celulares del
Departamento de Biología Celular y Anatomía Patológica.

Bienio 2001-2003

Tutor: Dr. Carles Enrich



UNIVERSITAT DE BARCELONA



III.-MATERIALES Y MÉTODOS

5 Aspectos generales

Todos los experimentos realizados con animales durante el desarrollo de este trabajo, fueron aceptados por el Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) de la Universitat de Barcelona, donde se llevaron a cabo los estudios.

5.1 Modelos animales

El modelo de ratón utilizado principalmente en este estudio fue el animal genomodificado (*knockin*) Cdk4R24C [42], inicialmente en un fondo genético CD1/129Sv y que posteriormente se retrocruzó a un background NOD incorporando o no la mutación *scid* (NOD/SCID). Por tanto, en la presente tesis, se ha trabajado con tres cepas animales distintas: **1)** el modelo Cdk4R24C en un fondo genético CD1/129Sv; **2)** el modelo Cdk4R24C en un fondo genético NOD (con susceptibilidad a desarrollar diabetes mellitus de tipo 1); y **3)** el modelo Cdk4R24C NOD/SCID (inmunodeficiente).

5.1.1 Condiciones de estabulación

Los ratones Cdk4R24C CD1/129Sv se mantuvieron en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universitat de Barcelona (UB) en condiciones de estabulación convencionales, ciclos de luz/oscuridad de 12 h, dieta estándar y agua *ad libitum*.

Dada la sensibilidad de la cepa NOD a cualquier factor ambiental o patogénico, el cual puede influir directamente en el desarrollo e incidencia de la diabetes, los ratones con fondo genético NOD se mantuvieron en el animalario de la Facultad de Medicina de la UB en condiciones cercanas o similares a las dictadas por las normas SPF (*Specific Patogen Free*), temperatura constante 20-23°C, ciclos de 12 h de luz y de oscuridad y agua y comida *ad libitum*. Las jaulas, viruta (Souralit 29/12 PLUS. SOURALIT. España), pienso (Global Diet 2018 S. HARLAN. Italia), agua y todo instrumento que debía entrar en contacto con los ratones se esterilizó previamente. Los ratones se estabularon en sistemas de racks ventilados con presión positiva y herméticamente cerrados (Techniplast, Italia). Los ratones se manipularon en una campana de flujo laminar. Como líquido desinfectante se usó TEGO® 51 al 2% (Th Goldschmidt, S.A.Barcelona. España). Para asegurar las condiciones SPF se realizó un control sanitario extenso de los ratones centinela (parasitología y bacteriología) anualmente y de serología trimestralmente.

Los animales Cdk4R24C NOD/SCID también se mantuvieron en condiciones similares a las dictadas por las normas SPF, dado su condición de NOD y su condición de SCID que hace que estos ratones no tengan ni linfocitos T ni linfocitos B y por tanto sean inmunodeficientes. Para evitar la aparición de cualquier infección oportunista en este modelo, se practicó la administración de antibióticos orales (Septrin®; trimetoprim 80 mg, sulfametoxazol 400 mg) a un régimen de 3 días por semana.

5.1.2 Cdk4R24C CD1/129Sv

El modelo Cdk4R24C CD1/129Sv fue cedido por el Dr. Mariano Barbacid director del Laboratorio de Oncología y Biotecnología Molecular en el Centro de Investigaciones Oncológicas (CNIO) de Madrid.

Para el genotipado del alelo R24C se procedió en primer lugar a la obtención del ADN genómico de la cola de los ratones. Con un bisturí estéril se practicó un corte en el extremo distal de la cola de los ratones a las 2-3 semanas de vida y se obtuvieron fragmentos de cola de 3-5 mm. Se procedió a la digestión de dichos fragmentos de cola con 250 µl de un tampón de lisis (Tabla II.1) que contenía 5 µl del enzima Proteinasa K 20 mg/ml (Gibco BRL). El proceso de digestión se realizó durante toda la noche (o/n) a una temperatura de 55°C, en un baño con agitación. Posteriormente se mezcló vigorosamente el contenido de cada tubo y se centrifugó a 17900 g durante 30 segundos con el fin de precipitar los fragmentos de tejido no digeridos. Los sobrenadantes de los lisados así obtenidos, contenían el ADN (ácido desoxirribonucleico) genómico que se utilizó para el genotipado mediante la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Las reacciones de PCR obtenidas se corrieron en geles de agarosa al 3%, 100 V, durante 3 h. Las muestras positivas para la forma mutada de la CDK4, Cdk4R24C, generaron una banda de 740 pb (pares de bases), mientras que las formas WT (wildtype) generaron una banda de 640 pb (Figura II.1). El motivo de esta diferencia de 100 pb, cuando la única diferencia en la proteína es la sustitución de un aminoácido, radica en la construcción usada para la generación del animal genomodificado, ya que éste contiene 100pb adicionales en la región 5' no traducida del fragmento que codifica la proteína Cdk4R24C, que el fragmento que codifica la proteína WT.

Composición	Concentración final	Concentración stock	Volumen stock (1l)
Tris pH= 8.0	50mM	1M	50ml

KCl	50mM	1M	50ml
EDTA	2,5mM	0,5M	5ml
NP-40	0,45%	100%	4,5ml
Tween-20	0,45%	100%	4,5ml

Tabla III.1. Tampón de lisis para la digestión del fragmento de cola del ratón, para la obtención del ADN genómico que servirá para el genotipado por PCR.

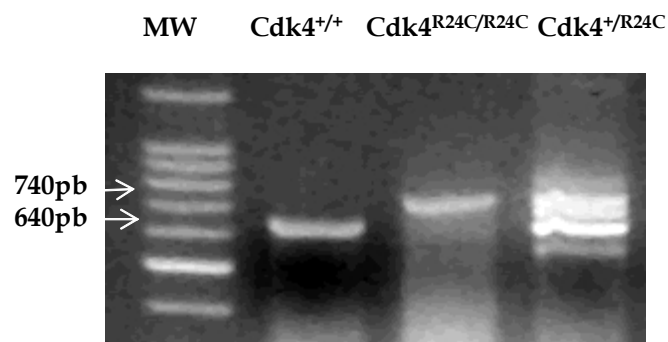


Figura III.1. Imagen de un gel de genotipado para el gen Cdk4R24C.

Reacción de PCR:

MgCl ₂	2,5 mM
Taq Polimerasa Buffer	1x
dNTPs:	200 μM
Taq Polimerasa:	0,02 U/μl
Primers (A+B):	1 μM
DNA:	1 μl

Condiciones de PCR:

1.- 94°C	3 min
2.-94°C	30 s
3.-57°C	30 s
4.-72°C	2 min
5.- ir al paso 2 (39 veces)	
6.-72°C	10 min

Las mezclas de reacción se llevaron a un volumen final de 25 μl con agua destilada.

Primers:

A: 3'-ACT GTG TGA TCC TCT TTG TG-5'

B: 3'ATC CAT CAG CCT GAG AAG-5'

5.1.3 Cdk4R24C NOD

5.1.3.1 Retrocruzamiento

Se realizó un retrocruzamiento intensivo de la cepa murina Cdk4R24C CD1/129Sv al fondo genético NOD, para obtener animales que expresaran la forma mutada Cdk4R24C en una cepa con predisposición genética a padecer diabetes autoinmune, la cepa NOD [112]. Para ello se procedió a cruzar un individuo Cdk4R24C CD1/129Sv con un individuo de la cepa NOD (NOD/Ltj). De la generación resultante (1ª generación o N1) se cruzó uno de sus miembros heterocigoto para la mutación Cdk4R24C con un individuo NOD. Así consecutivamente hasta alcanzar la generación N12 (retrocruzamiento 11). A partir de la 5ª generación, mediante PCR, se comprobaron los loci Idds (Insulin dependent diabetes susceptibility loci) o loci de susceptibilidad a diabetes, que determinan el nivel de fondo genético NOD del individuo, escogiendo cada vez y para el cruce sucesivo, aquellos individuos con mayor fondo genético NOD. En la generación 12 (N12) todos los individuos eran homocigotos para los alelos NOD de susceptibilidad a la diabetes. Los loci Idds presentan polimorfismos asociados a la susceptibilidad a desarrollar espontáneamente diabetes mellitus autoinmune por esta cepa. Existen muchos polimorfismos descritos de los cuales en la presente tesis se testaron 24, que comprendían distintas zonas del genoma murino entre el cromosoma 1 y el 17 (Tabla II.2).

5.1.3.2 Genotipado de los polimorfismos asociados

Se obtuvo ADN genómico de las colas de los ratones (ver apartado 5.1.2) y se procedió a realizar las reacciones de PCR.

Los primers para el genotipado de cada locus Idds se muestran en el anexo 1.

Se realizaron electroforesis en gel de agarosa al 4% de los productos de las reacciones de PCR a 90 V durante 3 h. Se compararon las muestras de las distintas generaciones con muestras de DNA de las cepas NOD, CD1, 129 Sv como controles (Figura II.2).

Reacción de PCR:

MgCl ₂	2,5 mM
Taq Polimerasa Buffer	1X
dNTPs:	200 µM
Taq Polimerasa:	0,02 U/µl
Primers (A+B):	1 µM
DNA:	1 µl

Condiciones de PCR:

1. 94°C 1 min
2. 55°C 1 min
3. 72°C 1 min
- 4.- ir al paso 1 (29 veces)
5. 10°C indefinido 10 min

Las mezclas de las reacciones de PCR se llevaron a un volumen final de 25 μ l con agua destilada.

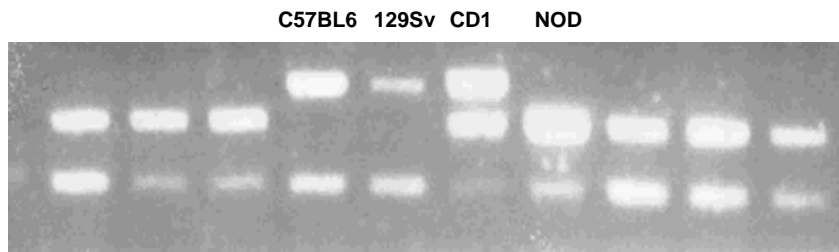


Figura III.2. Gel de electroforesis donde se compara el locus *Idds1* (D17Mit34) en las distintas cepas que forman parte del fondo genético del ratón, excepto la C57BL6 que se añade como cepa adicional, con distintas muestras obtenidas de un retrocruzamiento. Como se observa, todas las muestras tienen el fondo genético NOD para este locus *Idds*.

Para el genotipado del ratón para la mutación *Cdk4R24C* se realizó la misma PCR que para los ratones con fondo CD1/129Sv (ver apartado 5.1.2).

5.1.4 *Cdk4R24C* NOD/SCID

En 1983 Bosma et.al [171] observaron un ratón con una deficiencia severa combinada (*scid*) en un fondo genético C.B.-17, dando como resultado el ratón *scid*. Los ratones *scid* no desarrollan linfocitos T y B maduros debido a la imposibilidad de reorganizar los elementos de codificación de los genes de las inmunoglobulinas y de los receptores de células T [171]. Esta disfunción viene provocada por una mutación en la región carboxi-terminal de la subunidad catalítica de la proteína kinasa dependiente de DNA (*Prkdc*) [172]. Posteriores retrocruzamientos a un fondo genético NOD han dado como resultado la cepa NOD/SCID.

Estos animales tienen un background NOD de susceptibilidad a la DMT1, sin embargo no manifiestan insulinitis ni diabetes debido a la ausencia de linfocitos maduros.

Idd	Marcador microsatélite	CM	NOD	129/SvJ	CD1
Idd1	D17Mit34	18,8	125	147	125
Idd2	D9Mit25	26	133	106	133
Idd3	D3Nds6	19,2	108	108	
Idd3	D3Mit36	40,4	226		
Idd4	D11Mit115	37	105	98	105
Idd4	D11Mit320	43	124	134	
Idd5	D1Mit24	41,5	192		
Idd5	D1Mit26	64,5	222		
Idd6	D6Mit15	74	153	195	
Idd6	D6Mit339	65,5	110	99	
Idd6	D6Mit52	61,4	125	140	
Idd7	D7Mit20	5,5	95	103	
Idd8	D14Mit11	0,7	136	158	151
Idd9	D4Mit59	78,9	116	108	108
Idd10	Tshb				
Idd10	D3Mit103	51,1	132	113	132
Idd11	D4Mit202	56,8			
Idd12	D14Nds3				
Idd13	D2Mit257	61,2	137		
Idd13	D2Mit395	66,9	120	154	
Idd13	D2Mit17	69	237	218	237
Idd14	D13Mit61	22	180	166	166
Idd15	D5Mit69	1	164	140	
Idd15	D5Mit48	1	161	178	161

Tabla III.2. Marcadores genéticos utilizados para el análisis del fondo genético NOD y comparativa del peso molecular de los distintos loci Idds con las cepas 129/SvJ y CD-1. Adaptado de <http://www.informatics.jax.org>.

5.1.4.1 Retrocruzamiento

Para la incorporación de la mutación SCID en el fondo NOD Cdk4R24C, se cruzó un ratón Cdk4^{R24C/R24C} homocigoto para la mutación con un animal NOD/SCID WT. Del cruce se obtuvieron animales heterocigotos para la mutación R24C y para la mutación SCID. Se inter cruzaron un macho y una hembra de esta primera generación para obtener individuos NOD/SCID homocigotos para la mutación R24C y también individuos NOD/SCID WT, pero con el mismo fondo genético que los animales genomodificados y que se usaron como controles. Debido a que se realizaron dos retrocruzamientos adicionales de la cepa NOD Cdk4R24C a la cepa NOD/SCID, la cepa resultante es NOD Cdk4R24C /SCID N14 y no N12 como la cepa Cdk4R24C NOD.

5.1.4.2 Genotipado del alelo scid

El genotipado de los ratones NOD/SCID se realizó también mediante PCR del ADN genómico procedente de la digestión de fragmentos de cola (ver apartado 5.1.2). La reacción de PCR para la mutación SCID amplifica una región de la subunidad catalítica de la proteína-quinasa dependiente de DNA (Prkdc) [171, 172]. Se sabe que los ratones NOD/SCID tienen una mutación en el gen Prkdc generándose un sitio adicional de corte específico para el enzima de restricción Alu I. De la mitad de los productos de la PCR se hizo una digestión con el enzima Alu I. Las fracciones no digeridas se usaron como controles. Ambas fracciones, digeridas y no digeridas, se corrieron en un gel de electroforesis al 4% a 100 V durante 2 h. Si el ratón presentaba la mutación SCID, se generaban 3 bandas de 38, 28 y 11 pb, mientras que si no presentaba la mutación SCID, sólo aparecían 2 bandas de 68 y 11 pb. De la fracción sin digerir se obtenía una única banda de 79 pb.

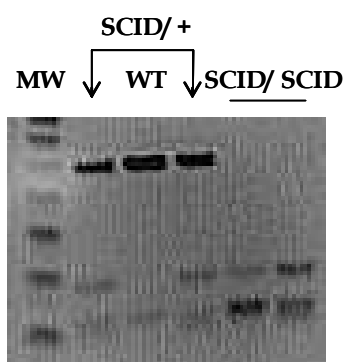


Figura III.3.- Gel de electroforesis de genotipado de los ratones NOD/SCID.

Reacción de PCR:		Condiciones de PCR:	
MgCl ₂	2,5 mM	1. 94°C	1,5 min
Taq Polimerasa Buffer	1x	2. 94°C	30 s
dNTPs:	200 µM	3. 53°C	30 s
Taq Polimerasa:	0,0125 U/µl	4. 72°C	30 s
Primers:	1 µM	5. ir al paso 2 (34 veces)	
DNA:	1 µl	6. 72°C	2 min

Se lleva a un volumen final de 25 µl con agua destilada.

Primers:

oIMR803 (sentido): 3'-GGA AAA GAA TTG GTA TCC AC-5'

oIMR804 (antisentido) 3'-AGT TAT AAC AGC TGG GTT GGC-5'

Reacción de digestión:

Producto de PCR:	10 µl
Buffer específico de Alu I 10x:	1X
BSA 10mg/ml:	0,12 µl
Alu I:	1 µl (0,5 U/µl)
H ₂ O:	5,68 µl

La mezcla de digestión se incubaba durante toda la noche a 37°C y después se inactivaba el enzima por calor durante 15 min a 65°C.

Para el genotipado de la mutación Cdk4R24C, se realizó la misma reacción de PCR, que se utilizó con el resto de cepas (ver apartado 5.1.2).

5.2 Condiciones generales de cultivo celular

Todos los cultivos de la presente tesis se cultivaron en un incubador a una temperatura de 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa. La manipulación de las líneas celulares y de los islotes pancreáticos se realizó en condiciones estériles en una campana de flujo laminar.

5.2.1 Condiciones de cultivo de los islotes pancreáticos aislados

Los islotes aislados se cultivaron en medio RPMI 1640 (Biosera. Reino Unido) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10%, 5ml de glutamina 200 mM en 0,85% NaCl (Biowhittaker. Bélgica) y 2 ml de penicilina/estreptomicina (5000 U penicilina/ml; 5000 U estreptomicina/ml) (Biowhittaker. Bélgica) por cada 500 ml de medio. Si la concentración de glucosa del medio era 11,1 mM se utilizó el medio RPMI 1640 11,1 mM glucosa de concentración final. A cualquier otra concentración se utilizó el medio RPMI 1640 sin glucosa y se pesó la glucosa necesaria para llegar a la molaridad deseada, se filtró con un filtro de poro 0,22 µm y se añadió al medio de cultivo ya suplementado.

5.2.2 Condiciones de cultivo de la línea celular 293-T

La línea celular 293-T se cultivó en medio DMEM 4,5 g/l de glucosa (Biowhittaker. Bélgica) con FBS al 10% (Biowhittaker. Bélgica), 5ml de glutamina 200 mM en 0,85% de NaCl (Biowhittaker. Bélgica) y 10 ml de penicilina/estreptomicina (5000 U penicilina/ml; 5000 U estreptomicina/ml) (Biowhittaker. Bélgica) por cada 500 ml de medio.

5.2.3 Condiciones de cultivo de los linfocitos murinos procedentes de bazo o nódulos linfáticos

Los linfocitos procedentes de bazo o nódulos linfáticos se cultivaron en medio RPMI 1640 (Biosera. Reino Unido) suplementado con FBS al 10%, 580 µl de gentamicina 0,058 mg/ml (Biowhittaker), 10 ml de glutamina 200 mM en 0,85% de NaCl (Biowhittaker. Bélgica), 10 ml de penicilina/estreptomicina (5000 U penicilina/ml; 5000 U estreptomicina/ml) (Biowhittaker. Bélgica) y 400 µl de β-mercaptoetanol 50 mM (Biowhittaker. Bélgica) por cada 500 ml de medio.

5.3 Obtención de los islotes pancreáticos de ratón

5.3.1 Canulación del conducto pancreático o colédoco

Se eutanizaron los ratones por dislocación cervical, se les practicó una incisión en la parte superior del abdomen hasta el final del mismo y se les buscó el inicio del intestino delgado donde se les halló el colédoco. Justo en la parte más cercana del colédoco al intestino se procedió al pinzamiento del intestino, para evitar que la solución de digestión inyectada se les desviara por él. A continuación, se les canuló el colédoco con una aguja de 27 o 30 G, dependiendo del tamaño del colédoco, y se les inyectaron 2 ml de una solución de colagenasa P (Roche) con solución de HBSS (Hanks' Balanced SALT Solution) (SIGMA) de 1,5 mg/ml. A medida que se les inyectaba la solución se observaba como los páncreas aumentaban de tamaño. Terminada la inyección se retiraron los páncreas y se depositaron en un tubo de 50 ml que contenía 1 ml de solución de colagenasa P a 3 mg/ml en HBSS. Una vez finalizado este proceso se dejaron los páncreas a 4°C hasta su digestión.

5.3.2 Digestión del páncreas

Las digestiones de los páncreas se realizaron en un baño a 37°C con agitación energética, durante 6-7 minutos (este valor es orientativo y depende mucho del lote de colagenasa P que se esté usando). Terminado el tiempo de incubación se retiraron los tubos del baño y se

dejaron en 4°C. Con la ayuda de una pipeta Pasteur de plástico se procedió a terminar la digestión manualmente, pipeteando varias veces hasta dejar una masa de tejido homogénea. A continuación, se añadieron 20 ml de HBSS con 1% FBS (Suero Fetal Bovino) frío y se dejaron reposar a 4°C durante 5 minutos, para que los islotes que tienen una densidad elevada se depositaran en el fondo del tubo junto con el exocrino, eliminando así restos de grasa y otros elementos tisulares menos densos. Transcurridos los 5 minutos, se procedió a eliminar los sobrenadantes con una pipeta Pasteur y se añadieron 20 ml más de solución de HBSS con 1% FBS. Se agitaron los tubos por inversión y se dejaron reposar durante 3 minutos más. Transcurrido ese tiempo se eliminó el sobrenadante del mismo modo y se añadió de nuevo solución de HBSS con 1% FBS a los precipitados, mezcla de islotes y tejido exocrino. A partir de estas suspensiones se procedió a la recolección o pesca de los islotes con una pipeta automática y con la ayuda de una lupa binocular. Si los islotes obtenidos no eran puros, se procedía a una segunda fase de pesca de islotes para separarlos del tejido exocrino contaminante restante.

5.4 Purificación de esplenocitos

Se extrajo el bazo de los ratones previamente eutanizados por dislocación cervical, y se introdujeron los tejidos en placas con medio RPMI 1640 al 10% FBS. Se disgregó el tejido usando vidrios esmerilados estériles (Menzel Glazer® 76mm x 26mm. Alemania), se descartaron los trozos de tejido no disgregado por sedimentación y se realizó un lavado con medio al 10% FBS. A continuación, se lisaron los eritrocitos con 900 µl de agua destilada a los que se les añadió rápidamente 100 µl de PBS 10X y 5 ml de medio para parar la reacción de lisis. Se centrifugaron las células a 458 g durante 5 min a 4°C, los precipitados se resuspendieron en un volumen conocido de medio y se realizó el recuento de las células.

5.5 Purificación de linfocitos a partir de nódulos linfáticos pancreáticos

Para la extracción de nódulos linfáticos pancreáticos se realizó la canulación del colédoco de los ratones y la digestión de los páncreas con colagenasa P (Roche. USA), del mismo modo que se describe en el apartado 5.3 para la extracción de islotes de ratón. Una vez digerido el páncreas, se recogieron los nódulos linfáticos con la ayuda de una lupa binocular, se colocaron en una placa de 5 cm de diámetro con 5 ml de medio y se disgregaron con 2 vidrios esmerilados (Menzel Glazer® 76mm x 26mm. Alemania). En el caso de los nódulos linfáticos no se realizó la lisis de los eritrocitos dada la escasez de éstos en los nódulos

linfáticos. Una vez disgregados los nódulos linfáticos, se lavaron las células, se resuspendieron en un volumen conocido de medio y se contaron.

6 Metodología utilizada para la caracterización del modelo Cdk4 R24C CD1/129Sv

6.1 Determinación de los parámetros metabólicos

6.1.1 Glicemia

Los niveles de glucosa en sangre se midieron mediante un glucómetro (Glucometer® Elite; Bayer. España) a partir de la sangre extraída mediante una ligera incisión en la cola del ratón.

6.1.2 Insulinemia

A partir de la sangre extraída de la cola del ratón y recogida en un tubo con anticoagulante (Microvette® CB 300 KE-SARSTEDT), se procedió a la obtención del plasma mediante centrifugación del tubo a 1272 g durante 20 min a 4°C. Se recogió el sobrenadante que correspondía al plasma. La insulinemia se midió a partir del plasma mediante la técnica de RIA (radioinmunoensayo) (Insulin-CT, CIS bio International, Cedex, Francia).

6.2 Ensayos morfométricos

Los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical. Se extrajo el páncreas, se fijó en una solución al 4% de paraformaldehído en PBS y se deshidrató en una solución de sacarosa al 30%. Las criosecciones obtenidas se incubaron con un anticuerpo de conejo de indias (guinea-pig) anti-insulina a una dilución 1/500 (ref.651041. ICN), a continuación se incubaron con un anticuerpo secundario anti-conejo de indias conjugado con peroxidasa (A9761. SIGMA) a una dilución 1/500. Para el revelado de la actividad peroxidasa se utilizó el sustrato de peroxidasa (AEC-chromogen kit. SIGMA). Además se realizó un contrastado con azul de toulidina para teñir la totalidad del islote pancreático. La cuantificación de la superficie de célula beta respecto al islote se realizó mediante microscopía óptica y el MicroImage software (Hamburg, Alemania).

6.3 Determinación del contenido de insulina del islote

Una vez obtenidos los islotes (ver apartado 5.3), se centrifugaron a 70 g durante 10 min a 4°C. Se resuspendieron en 1 ml de solución alcohólica ácida (15 µl HCL 37% + 750 µl ETOH

100%), se sonicaron durante 20 segundos a 25 vatios y se dejaron durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se centrifugaron los islotes a 660 g durante 10 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se utilizaron para determinar el contenido de insulina mediante la técnica de RIA (Insulin-CT, CIS bio International, Cedex, Francia). Los resultados se expresaron como ng de insulina/10 islotes.

6.4 Biosíntesis y conversión de proinsulina a insulina

6.4.1 Marcado radioisotópico y separación de la insulina

Se aislaron los islotes, siguiendo el método descrito en el apartado 5.3, y se realizaron grupos de 60 islotes por condición. Se sometieron a un pulso de 10 min de metionina S³⁵ (Amersham) y se dejaron en cultivo en presencia de glucosa a una concentración de 16.7 mM, a distintos tiempos (30, 60, 180 y 300 min). Transcurrido el tiempo, se centrifugaron las distintas suspensiones de islotes y se procesaron por separado sobrenadante e islotes.

Por una parte, el precipitado de islotes se resuspendió con tampón de lisis (LB) (25 mM borato sódico (Na₂B₄O₇), 1 mM EDTA, 0,1% acida sódica (NaN₃), 1% Tween 20, 3% BSA (Bovine Serum Albumina) con inhibidores de proteasas, concretamente: PMSF (2 mM), aprotinina (3 µg/ml), EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) (2 mM), pepstatina A (3 µM), TPCK (L-1-Chloro-3-[4-tosylamido]-4-phenyl-2-butanone) (0,3 mM), E64 (10 µM). Los islotes se sonicaron durante 20 segundos a 25 vatios, manteniéndolos en hielo. Por otro lado, al sobrenadante obtenido durante el proceso de marcado, se le añadió el mismo volumen que tenía pero de tampón de lisis (LB) 2 veces concentrado y con inhibidores de proteasas a las mismas concentraciones que para los islotes. Se recogió el sobrenadante fruto de la sonicación de los islotes y el sobrenadante obtenido en el proceso de marcado, se incubaron 1 h con 50 µl de solución de Cowan a 100 mg/ml en tampón de lisis (SIGMA), a temperatura ambiente y en rotación. La solución de Cowan es una suspensión de células bacterianas que evita las uniones inespecíficas. Posteriormente se centrifugaron las muestras durante 20 s a 203 g a temperatura ambiente. A los sobrenadantes obtenidos, se les añadieron 100 µl de IMAD B37 (insulin immunoabsorbent) y se incubaron durante toda la noche a 4°C y en rotación. El IMAD B37 (insulin immunoabsorbent) (cedido por el Dr. John Huton. Departamento de Bioquímica Clínica, Universidad de Cambridge, UK) es una matriz sólida a la cual va unido el anticuerpo anti-insulina.

Al día siguiente, se centrifugaron las muestras durante 20 s a 3800 g a 4°C, obteniendo dos fracciones, por una parte el sobrenadante que contiene las proteínas no unidas al IMAD y

que se utilizaron como base de normalización por la cantidad de proteína total marcada, y por otra, el precipitado que contenía la matriz IMAD con la insulina unida. De la matriz IMAD-B37-insulina se realizaron una serie de lavados con 600 μ l cada uno, centrifugando cada vez a 3800 g durante 20 s: 3 lavados se efectuaron con tampón de lisis LB, 2 con tampón RIPEA (50 mM TRIS ph=7,5, 150 mM NaCl, 1% TRITÓN X-100, 0,1% SDS, 5 mM EDTA Na, 1% DocNa (deoxicólico sódico)) y por último un lavado con agua destilada.

Para la elución de la insulina se añadieron 400 μ l de ácido acético al 25% en agua destilada y se centrifugaron 1 min a 3800 g, previamente se había agujereado el tubo que contenía la fracción IMAD y se había colocado un tubo debajo para recoger la elución. La muestra obtenida de la elución se sometió a un vacío acelerado (*speed-vac*) durante toda la noche a temperatura ambiente para eliminar el ácido acético. El precipitado seco se podía guardar a -70°C hasta su utilización o resuspenderlo con 50 μ l de tampón de carga (62 μ l agua, 888 μ l de urea desionizada, 50 μ l TRIS 0,5 M PH=8,3, azul de bromofenol) para la posterior electroforesis.

6.4.2 Electroforesis en condiciones no desnaturalizantes

Dado el bajo peso molecular de la insulina y de la proinsulina 6kDa aproximadamente, se realizaron electroforesis en gel alcalino de urea (7,5 ml acrilamida al 40%, 7,87 ml Bis-acrilamida 1%, 14,4 g urea, 2 ml tampón de electroforesis 10x, 310 μ l persulfato amónico 10%, 62,5 μ l TEMED y 12 ml agua destilada). Antes de correr las muestras se realizó una fase de pre-corrída (*pre-run*), con tampón de muestra a 500V durante 1h. Con el fin de eliminar el persulfato y los contaminantes originados por la urea y la acrilamida durante la polimerización del gel. A continuación se cambió el tampón de electroforesis de la cubeta y se cargaron los marcadores de peso molecular marcados con 14 C (Amersham) y las muestras experimentales. Las electroforesis se dejaron correr durante 1 h a 500 V. Al finalizar esta hora, se cargó de nuevo un carril con tampón de muestra y se volvieron a correr los geles 1 h más a 500 V. Finalmente se realizaron las fluorografías de los geles.

6.4.3 Fluorografía

Una vez finalizada la electroforesis, se fijaron los geles sumergiéndolos en una solución de ácido acético glacial (SIGMA) durante 10 min en agitación suave, cambiando la solución una vez. Después se sumergieron los geles en una solución de 2,5-difeniloxazol (PPO-Merck) al 20% en ácido acético glacial durante 45 minutos con agitación suave y posteriormente se lavaron con agua del grifo. A continuación se colocaron los geles sobre un papel de filtro

Whatman 3MM que servía de soporte físico al gel y se cubrió el conjunto con un plástico fino transparente del tipo Saran-Wrap. Los geles se secaron con un secador de geles (Slab Dryer. Bio Rad) y una vez secos se colocaron dentro de un cassette en contacto con la película autorradiográfica (X-OMAT AR (KODAK)). La exposición era variable, oscilando entre 2 y 7 días a -70°C .

6.5 Secreción de insulina por perfusión

Se aislaron islotes pancreáticos (ver apartado 5.3) y se distribuyeron en grupos de 30 islotes por condición experimental en una solución de preincubación que contenía 1ml de solución I (460 mM NaCl), 1 ml de solución II (NaHCO_3 96 mM, KCl 20 mM y $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 4 mM, previamente gaseada durante 5-10 minutos), 1ml de la solución III ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 4 mM) y 5 mg/ml de BSA). Los islotes fueron incubados inicialmente con la solución de preincubación a 2,8 mM de glucosa durante 30 min a 37°C (figura II.4). Durante este tiempo no se recogieron alícuotas. Transcurridos los 30 min, se cambiaron los islotes a una cámara de incubación con una solución 2,8 mM de glucosa y se incubaron durante 15 minutos con la solución de incubación (3 g de albúmina, 150 ml solución I, 150 ml de solución II gaseada, 150 ml de solución III y 150 ml de agua destilada) a 2.8mM de glucosa. Transcurrido este tiempo, la solución 2,8 mM de glucosa se reemplazó por una solución 16.7 mM de glucosa durante 30 min, para volver de nuevo a una solución de 2.8 mM de glucosa durante 15 minutos más. A lo largo de todo el proceso se fueron recogiendo muestras del sobrenadante (1ml/min). La cantidad de insulina existente se determinó mediante la técnica de RIA (Insulin-CT, CIS bio International, Cedex, Francia).

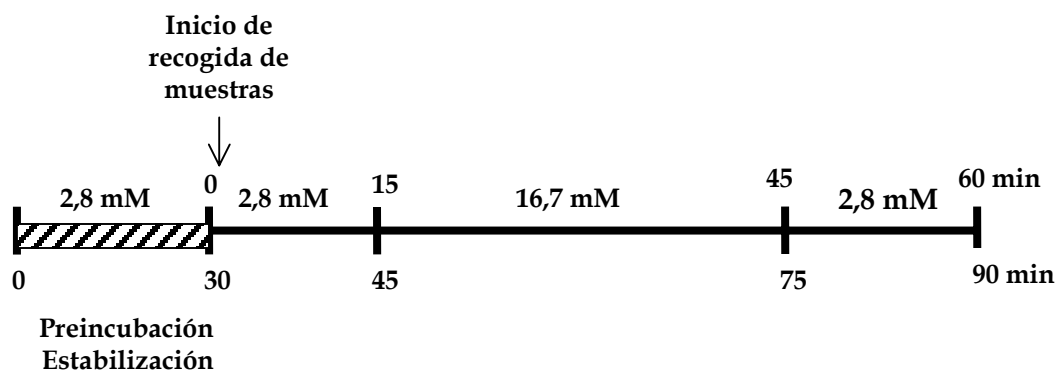


Figura III.4. Esquema del experimento de perfusión de los islotes

6.6 Test de tolerancia intraperitoneal a la glucosa (TTIPG)

Para la realización de este test se usaron animales ayunados durante 16 h y se anestesiaron con pentobarbital sódico al 5% 50-70 mg/kg. Una vez dormidos, se midió la glicemia basal (Glucometer®-Bayer) y se tomó una muestra de sangre de la cola del ratón con tubos tratados con anticoagulante (Microvette® CB 300 KE-SARSTEDT) para determinar la insulinemia mediante la técnica de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) (kit MERCODIA Ultrasensitive Rat Insulin ELISA, Upsala, Suecia). A continuación se inyectó una solución de suero glucosado (Braun G40), 2 g/kg de peso corporal, intraperitonealmente (agujas de 25G de grosor). A los 15, 30, 60 y 120 min post-inyección de glucosa, se midió la glicemia (Glucometer®-Bayer) y se tomaron muestras de sangre para la determinación de la insulinemia.

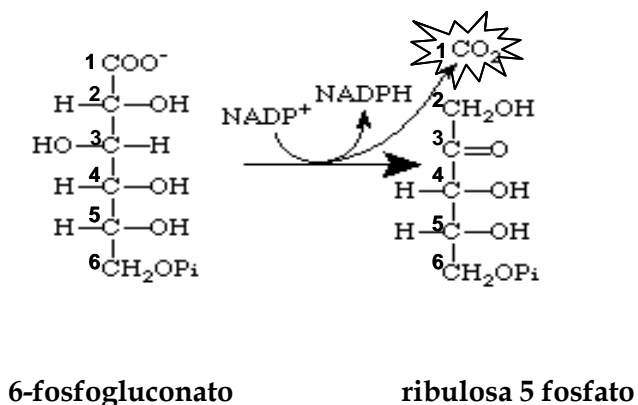
Las muestras de sangre colectadas en tubos tratados con anticoagulante (Microvette® CB 300 KE-SARSTEDT), se mantuvieron a 4°C hasta su centrifugación a 660 g durante 20 min a 4°C. Después de la centrifugación se recogieron los sobrenadantes, que correspondían al plasma, y se guardaron a -70°C hasta la determinación de la insulinemia.

6.7 Oxidación y utilización de glucosa

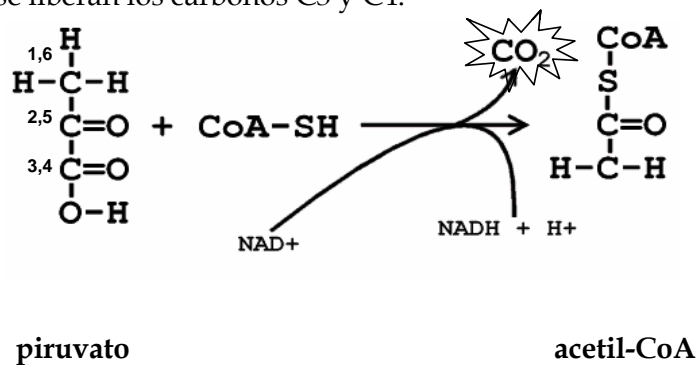
6.7.1 Oxidación

El protocolo de oxidación de la glucosa se basa en la medición de la generación de CO₂ por la cascada del complejo piruvato deshidrogenasa, la vía de las pentosas fosfato y el ciclo de Krebs. Por ello, se usó como sustrato la glucosa marcada radioisotópicamente de forma uniforme en todos sus átomos de carbono (D-(U¹⁴C)glucosa), para asegurar una medida global de la oxidación. Concretamente, se midió la liberación de ¹⁴CO₂ en tres etapas:

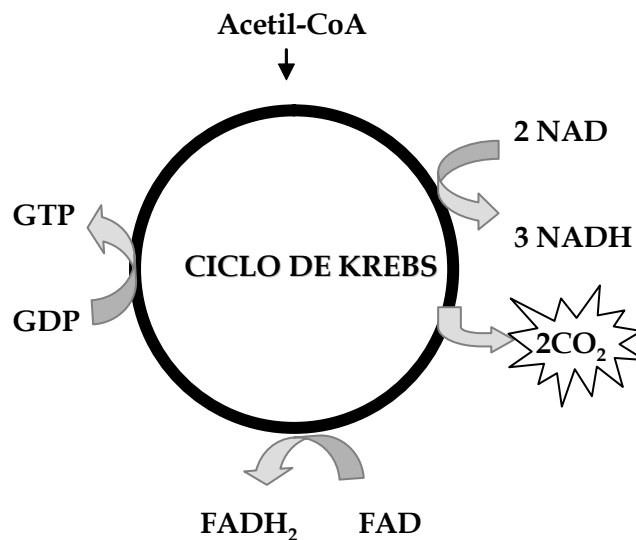
1.- En la primera etapa se libera el carbono de la posición 1 a nivel del enzima 6-fosfogluconato deshidrogenasa de la vía de las pentosas fosfato.



2.- En la segunda etapa, se recupera también $^{14}\text{CO}_2$ del complejo piruvato deshidrogenasa. Concretamente se liberan los carbonos C3 y C4.

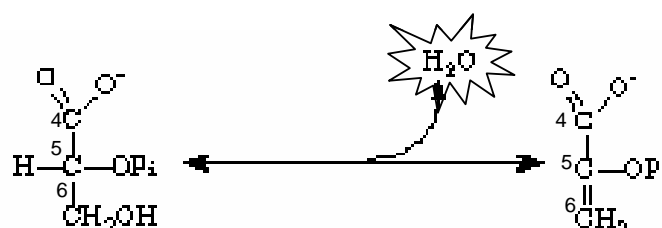


3.- Finalmente en el ciclo de Krebs, se liberan los carbonos restantes.



6.7.2 Utilización

Respecto a la utilización de la glucosa, se midió el agua generada en la glicólisis, concretamente en el paso de 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato, mediado por el enzima enolasa. Debido a la deshidratación del 2-fosfoglicerato, se libera una molécula de agua. Uno de los hidrógenos del H₂O pertenece al C5 de la molécula de glucosa, es por ello que la glucosa que se usó en este caso fue la glucosa tritiada en el carbono 5 (D-(5-³H)glucosa).



6.7.3 Protocolo general

En primer lugar, se preparó medio CM (Collect Media) (10 ml NaCl 460 mM; 10ml de una solución que contenía NaHCO₃ 96 mM, KCl 20 mM, MgCl₂ 4 mM; 10 ml de CaCl₂ 4 mM y 10 ml de agua destilada) a pH=7.4, gaseado 5-10 minutos, para la incubación de los islotes. Una vez gaseada la solución se suplementó con albúmina a una concentración final de 5 mg/ml.

En segundo lugar, se aislaron los islotes (ver apartado 5.3), se pescaron con medio CM y se dividieron en grupos de 20 islotes por condición. A continuación se extrajo el máximo de medio CM de los viales donde se habían depositado los islotes, extremando el cuidado para no eliminar con el medio ningún islote y se añadieron 40µl de solución A o B en función de la concentración de glucosa en cada condición.

Solución A: 20 µCi D-(5-³H)glucosa (actividad específica (AE)=19 Ci/mmol) y 10 µCi de D-(U¹⁴C)glucosa (AE=300 mCi/mmol) en una solución de glucosa 5,5 mM en medio CM, siendo el volumen final de 750 µl.

Solución B: 20 µCi D-(5-³H)glucosa (AE=19 Ci/mmol) y 10 µCi de D-(U¹⁴C)glucosa (AE=300 mCi/mmol) en una solución de glucosa 16.7 mM en medio CM, siendo el volumen final de 750 µl.

Los viales que contenían los islotes se depositaron dentro de unos viales de cristal de 20ml de capacidad, que ya contenían 0,5 ml de HCl 0,1 M en el fondo y otro tubo de plástico vacío (ver figura II.5).

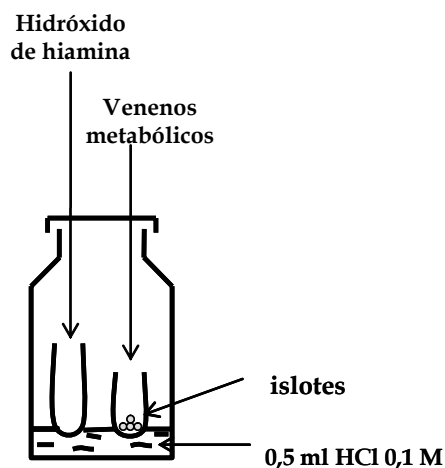


Figura III.5. Disposición de los viales para la incubación de los islotes durante la prueba de oxidación y utilización de glucosa.

A continuación, los viales se taparon con un septo de goma y se pusieron en un baño con agitación suave a 37°C durante 2 h, gaseando los viales con una aguja a través del septo durante los primeros 5 minutos de la incubación. Transcurridas las dos horas, se paró la reacción mediante la inyección a través del septo y sin abrir los viales, de 250 µl de hidróxido de hiamina (Carlo Erba-Italia) en el tubo vacío y 20 µl de una mezcla de venenos metabólicos (10 µM Actinomicina-A (SIGMA), 10 µM rotenona (SIGMA), 5 mM cianuro de potasio (SIGMA)) en los tubos que contenían los islotes. Los viales se incubaron durante 60-90 min a 37°C. Durante este tiempo, la mezcla de venenos actúa sobre la cadena respiratoria provocando la liberación del CO₂ de las células, éste es captado por el hidróxido de hiamina que se ha depositado en el tubo inicialmente vacío. Transcurrido el tiempo de incubación se extrajeron los tubos que contenían el ¹⁴CO₂ atrapado en el hidróxido de hiamina, se secaron bien por la parte de fuera y se depositaron en un vial de centelleo con 12 ml de líquido de centelleo. Se taparon de nuevo los viales de cristal y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 h para captar el ³H₂O en la solución de HCl. Transcurridas las 20 h, se extrajeron los tubos que contenían los islotes y se añadieron 5 ml de líquido de centelleo en los viales de cristal que contenían el ³H₂O atrapada en el HCl.

El recuento de las emisiones β radioisotópicas se efectuó en un contador con doble canal, uno para el ¹⁴C y uno para el ³H, ya que se trató con dos isótopos en el mismo experimento.

Es importante tener en cuenta el solapamiento que se puede producir en la detección de los dos isótopos. Para que el experimento fuese válido el nivel de solapamiento no debía superar el 20%.

Los cálculos efectuados en este experimento se encuentran detallados en el anexo 2.

7 Metodología utilizada para el estudio de la influencia de la mutación Cdk4R24C en el comportamiento fisiológico de islotes humanos aislados

7.1 Obtención de islotes pancreáticos humanos. Aislamiento y purificación

Los páncreas usados en este estudio se obtuvieron de donantes cadavéricos multiórgano no diabéticos, previo consentimiento de los familiares.

Una vez recibidos los páncreas se realizó una inspección visual y se procedió a su pesado. Posteriormente se eliminó el tejido adiposo peripancreático, ganglios linfáticos y vasos sanguíneos más visibles (ver figura III.6a). A continuación se practicó una resección de la

cabeza pancreática para su congelación. Para la congelación de las cabezas pancreáticas se sumergieron en un recipiente con isopentano que posteriormente se introdujo dentro de otro que contenía acetona con nieve carbónica. De este modo, los tejidos quedaron rápidamente congelados. Posteriormente se guardaron a -80°C . Los restos de páncreas no congelados fueron utilizados para la obtención de islotes.

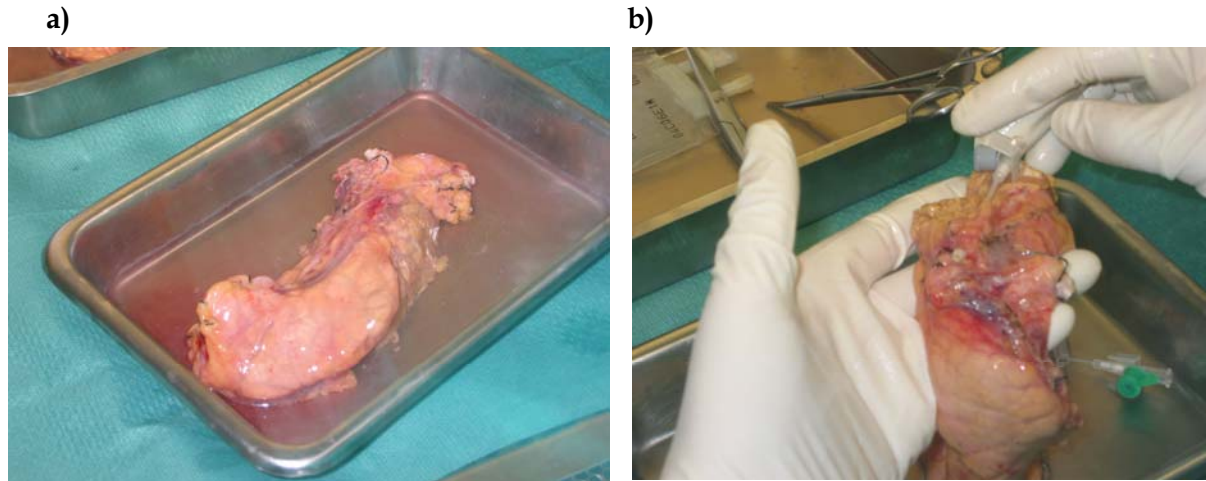


Figura.III.6 a) Imagen de un páncreas humano, previa la extracción del tejido adiposo y vasos sanguíneos que interferirían con la digestión. b) Proceso de canulación del conducto de Wirsung, para la inyección de la solución de colagenasa.

7.1.1 Digestión

Para la digestión de los páncreas se utilizó una solución de 2 ml de HBSS por gramo de tejido procesado, con 3,5 mg de colagenasa por ml de HBSS y 0,04 mg de desoxirribonucleasa por ml de HBSS. Se canuló el conducto de Wirsung con un catéter Veflon y se inyectó la solución de digestión previamente templada a 37°C (ver figura III.6b). El grosor del catéter variaba en función del grosor del conducto. A continuación, se trocearon los páncreas en cabeza, cuerpo y cola, para facilitar la digestión, y se introdujeron en recipientes estériles con tapón de 100 ml de capacidad, al baño a 37°C y con agitación. Dentro de los recipientes con el tejido, se introdujeron también unas canicas de cristal para favorecer la digestión.

7.1.2 Monitorización de la digestión

A los 15 minutos del inicio de la digestión y en intervalos de 5 minutos, se recogieron muestras de la digestión y se tiñeron con una solución de difeniltiocarbazona ó ditizona (DTZ) previamente filtrada con filtros de $0,22\ \mu\text{m}$ de poro (DTZ 1% p/v en DMSO diluida 1/20 en HBSS). La DTZ tiñe de rojizo los iones de Zn^{+2} presentes en los gránulos de insulina,

facilitando su identificación (ver figura III.7) Se pararon las digestiones, cuando se observaron islotes sueltos y totalmente limpios de tejido exocrino, introduciendo los recipientes de digestión en hielo. El material digerido se coló, para eliminar restos de tejido no digerido y se introdujo en frascos de 200 ml que contenían 2,5 ml de FBS. Se realizaron 3 lavados con HBSS-1% FBS frío a 500 g durante 5 minutos y a 4°C. En cada lavado se fueron juntando los distintos precipitados de la digestión hasta obtener uno único al final del tercer lavado.

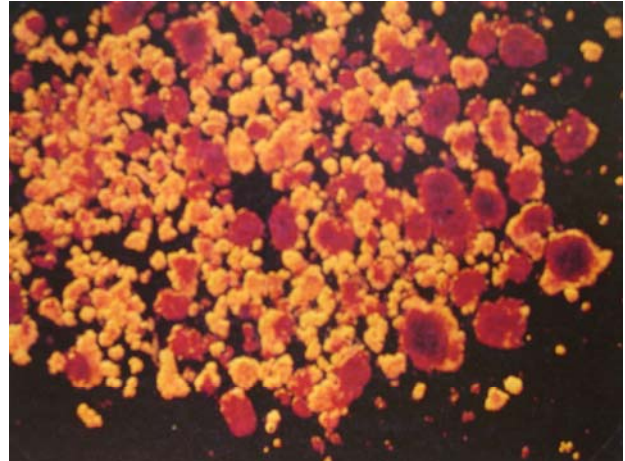


Figura.III.7. Islotes teñidos con DTZ (en rojo), tejido exocrino sin teñir (en amarillo).

7.1.3 Recuento de islotes pre-gradiente

Los últimos precipitados obtenidos se resuspendieron en un volumen conocido de HBSS-FBS y se tomaron dos muestras, una de 50 μ l y otra de 100 μ l, que se tiñeron con la solución de DTZ. Se esperó unos dos minutos a que se tiñeran los islotes y se contaron con la ayuda de una lupa binocular. Utilizando un objetivo con micrómetro incorporado se realizó el recuento diferencial por tamaño.

7.1.4 Purificación de los islotes pancreáticos

La purificación de los islotes se realizó mediante gradientes de densidad discontinuos de Ficoll con 3 fases:

1.-Los precipitados obtenidos de la digestión se resuspendieron en una solución de Ficoll de densidad 1,1 g/l. Por cada ml de volumen de precipitado se añadieron 10 ml de Ficoll 1,1 g/l. Se añadió 1ml de precipitado por tubo de 50 ml.

2.-La segunda fase consistió en una solución de Ficoll de densidad 1,058g/l a partir de la solución inicial de Ficoll 1,1g/l diluida con HBSS-1% FBS (10ml por tubo).

3.-Finalmente la tercera fase consistió en 10 ml de HBSS-1% FBS, añadida con sumo cuidado a la parte superior de los tubos.

El gradiente se centrifugó a 800 g durante 20 min a 20°C. Los islotes se recuperaron de la interfase Ficoll 1,058 g/l - HBSS 1%FBS y se lavaron 3 veces con HBSS-1% FBS frío.

7.1.5 Recuento de islotes post-gradiente

Se realizó del mismo modo que el recuento pre-gradiente (ver apartado 7.1.3) y posteriormente se calculó el rendimiento teniendo en cuenta el número de islotes obtenidos antes y después del gradiente.

Posteriormente, se recogieron los islotes con la ayuda de una lupa binocular y de una pipeta automática para asegurar el 100% de pureza de la muestra.

7.1.6 Viabilidad de los islotes pancreáticos

Este ensayo determina la viabilidad de los islotes inmediatamente después de su purificación. Se tiñeron los islotes con naranja de acridina y bromuro de etidio. El naranja de acridina informa de la integridad de la membrana plasmática y el bromuro de etidio se intercala en el ADN de células muertas. Utilizando luz UV, si las células eran viables aparecían de color verde debido al naranja de acridina, mientras que si no lo eran aparecían de color naranja.

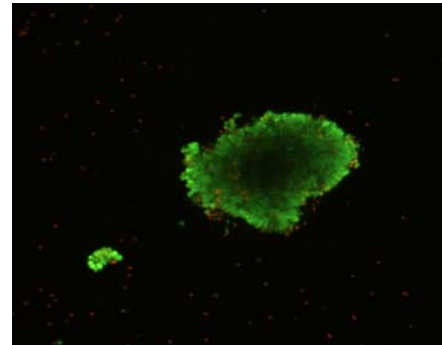


Figura III.8. Imagen de un islote teñido con bromuro de etidio y naranja de acridina, para determinar su viabilidad.

7.2 Lentivirus

7.2.1 Construcciones lentivirales

Los lentivirus utilizados para la realización de la presente tesis están basados en el virus del VIH-1 (virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1) con la cápside del virus de la estomatitis vesicular para aumentar el número de tejidos susceptibles de ser infectados.

Las partículas lentivirales finales se obtuvieron a partir de la cotransfección de 3 plásmidos cedidos por el Dr. B Thorens de la universidad de Lausanne: pCMVΔR8.7, pMDG, pHR' [173, 174].

pCMVΔR8.7: Este plásmido recibe el nombre de vector *helper* o ayudador. Contiene los genes *gag* y *pol* que codifican para las proteínas responsables del núcleo del virus y para los enzimas replicativos virales respectivamente, bajo la acción del promotor del Citomegalovirus. Contiene al final, una secuencia de poliadenilación del gen de la insulina en sustitución del fragmento LTR (long terminal repeat) en la posición 3'.

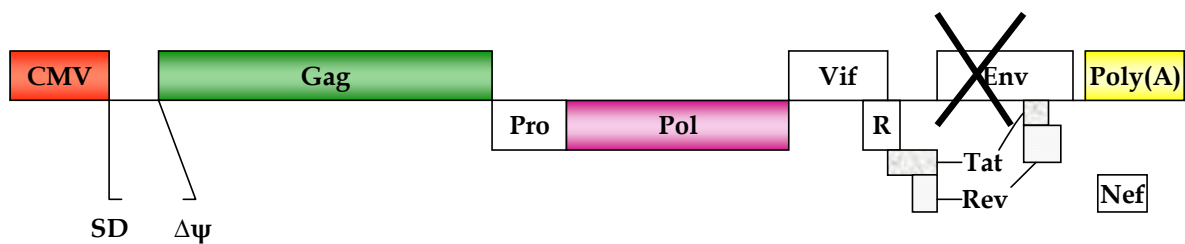


Figura III.9. Esquema del vector pCMVΔR8.7.

pMDG: Este plásmido contiene el gen *env* del virus de la estomatitis vesicular (VSV) que codifica para las proteínas de la cápside del virus dando más estabilidad al virus para la concentración de partículas por ultracentrifugación y ampliando el espectro de tejidos susceptibles de ser infectados por dichas partículas virales.



Figura III.10. Esquema del vector pMDG.

pHR': Este plásmido por un lado contiene el gen reportero (EGFP o LacZ) o el gen de interés que deseamos transducir que en este caso corresponde al cDNA de la Cdk4R24C, y por otro, contiene los elementos en cis del virus del HIV, necesarios para el empaquetamiento, la transcripción reversa y la integración del virus, bajo el promotor del citomegalovirus.

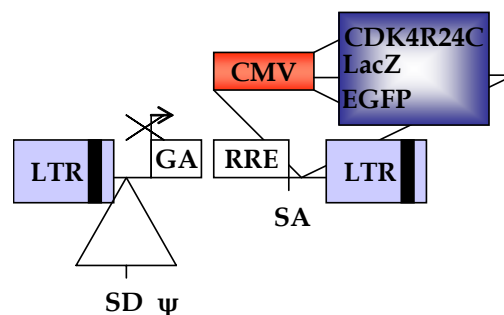


Figura III.11. Esquema del vector pHR'.

7.2.2 Producción de partículas lentivirales

Para la producción de partículas lentivirales se usó la línea celular 293-T, originada a partir de fibroblastos humanos de riñón (ver apartado 5.2.2 para las condiciones de cultivo de esta línea celular). Se plantaron de 2-2,5 millones de células 293-T por placa de 10 cm de diámetro y se dejaron en cultivo durante toda la noche. Al día siguiente se cambió el medio de cultivo y se añadió cloroquina (25 μM) para inhibir las DNAsas lisosomales. Se mantuvieron las células en cultivo y mientras tanto se prepararon los plásmidos para su co-transfección.

7.2.2.1 Prueba de precipitados de los plásmidos

La prueba de precipitados se realizó para determinar que proporción de fosfato sódico se debía usar para la transfección. Esta prueba debía llevarse a cabo cada vez que se utilizaba una nueva preparación de plásmido. Para ello fue necesario que todos los plásmidos tuvieran una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y que todas las soluciones estuvieran a temperatura ambiente.

Se mezclaron la solución A y la solución B (ver tabla III.3), en sus distintas condiciones y se dejaron 1 min exacto. A continuación se añadió la mezcla de solución A y de solución B en una placa de 24 pozos que contenía 1 ml de medio.

soluciones	componentes	condición 1	condición 2	condición 3	condición 4
<i>SOLUCIÓN B</i>	H ₂ O	425	425	425	425
	CMV Δ R8.7	7,5	7,5	7,5	7,5
	pMDG	2,5	2,5	2,5	2,5
	pHR' (*)	10	10	10	10
	CaCl ₂	50	50	50	50
<i>SOLUCIÓN A</i>	2X HEPES	492	490	488	486
	100x Na _x PO ₄	8	10	12	14

Tabla III.3. Soluciones utilizadas en la prueba de precipitados. Valores expresados en μl . (*)Este plásmido cambiaba en función de la proteína que se deseaba expresar.

Soluciones de la prueba de precipitados

CaCl₂ 2,5 M

2x HEPES: 10 g/l HEPES + 16 g/l NaCl. Ajustar el pH con NaOH entre 7,05 i 7.10.

100X Na_xPO₄: 70 mM Na₂HPO₄, 70 mM NaH₂PO₄

Se observó, con la ayuda de un microscopio, el tamaño de los precipitados que debían ser redondos y del tamaño de un bacterio de coco.

Una vez determinada la proporción de fosfato sódico que había que añadir para formar los precipitados adecuados para la transfección, se procedió a co-transfectar las células 293-T con los 3 plásmidos que generaban las partículas lentivirales.

7.2.2.2 Transfección de las células 293-T

Se mezcló la solución A (0,5 ml) y la solución B (0,5 ml) (Tabla III.4), con la proporción de fosfato sódico determinada en la prueba de precipitados, durante 1 min exacto para que se formaran los precipitados y luego se añadió la mezcla a las placas donde se habían dejado en cultivo las células 293-T. Se incubaron las células con los precipitados durante un período de 6 a 16 h a 37°C. Transcurrido este tiempo, se extrajo el medio con los precipitados de la placa y se añadió medio de cultivo con 10 mM de butirato sódico que es un activador de los promotores. Se incubaron las células durante 24 horas. Al día siguiente se recogió el medio, que contenía las partículas lentivirales, se filtró con un filtro de 0,45 µm de poro y se alicuotó en tubos de 15 ml para congelarlo a -80°C. Si se deseaba usar las partículas lentivirales el mismo día se dejaba a 4°C.

soluciones	componentes	1 placa	2 placas	3 placas	4 placas
<i>SOLUCIÓN B</i>	H ₂ O	425	850	1275	1700
	CMVΔR8.7	7,5	15	22,5	30
	pMDG	2,5	5	7,5	10
	pHR' (*)	10	20	30	40
	CaCl ₂	50	100	150	200
<i>SOLUCIÓN A</i>	2X Hepes	490	980	1470	1960
	100x Na _x PO ₄	10	20	30	40

Tabla III.4. Soluciones para la co-transfección de los plásmidos en células 293-T para la producción de las partículas lentivirales. Valores expresados en µl. (*)Este plásmido cambiaba en función de la proteína que se deseaba expresar.

Los lentivirus se inactivan a temperatura ambiente y cada vez que se descongelan pierden la mitad de su actividad. Cuando se deseaba utilizarlos, había que descongelarlos a 37°C y

después colocarlos a 4°C rápidamente. Es necesario tener en cuenta las veces que se descongelan para saber la actividad viral.

7.2.2.3 Determinación de la actividad lentiviral

Debido a que los lentivirus producidos tienen su origen en el VIH (virus de la inmunodeficiencia adquirida), para determinar su actividad se utilizó el kit INNOTEST™HIV Antigen mAb (Innogenetics). Es un kit de ELISA que reconoce la proteína P24 antigénica nuclear de los virus VIH y que también se expresa en las partículas lentivirales utilizadas en la presente tesis. Para saber la actividad se tuvo en cuenta que 1 ng de proteína P24, equivale a 4500 unidades infectivas (I.U).

7.2.3 Infección lentiviral de islotes humanos

Los islotes humanos se aislaron y purificaron (ver apartado 5.3) y posteriormente se dejaron en cultivo durante toda la noche a 11,1 mM glucosa (ver apartado 5.2.1 para las condiciones de cultivo) con el objetivo de que los islotes se recuperasen después del proceso de digestión. Al día siguiente, se cambió el medio y se dejaron los islotes con un medio a 5,5 mM glucosa. Transcurridas 24 h, se infectaron los islotes. Para ello, previamente se disgregaron ligeramente los islotes, con el fin de favorecer la entrada de los lentivirus al centro del islote y que la eficiencia de infección fuese mayor. Para la disgregación de los islotes se utilizó una solución de disgregación que contenía: NaCl 36,2 mg, KCl 2 mg, MgSO₄ · 7H₂O 1 mg, NaH₂PO₄ 0,6 mg, NaHCO₃ 6 mg, HEPES 1,9 mg, 1 ml EGTA(1 mM/l) llevada hasta un volumen final de 5 ml con agua destilada.

Los islotes se incubaron con 400 µl de esta solución de disgregación durante 5 min a 30°C y luego se paró la reacción centrifugando los islotes a 200 g 2 min a 4°C. Se extrajo el sobrenadante y se añadieron las partículas lentivirales a razón de 6000 IU por islote. Se dejaron los islotes y los virus en cultivo durante 4 h a 37°C en una placa de 5 cm de diámetro. Transcurrido este tiempo, se añadieron 5 ml de medio 5,5 mM glucosa y se dejaron 3 días en cultivo antes de realizar cualquier ensayo.

7.3 Detección de los islotes infectados

Para asegurarse que la infección había sido buena, se realizó una infección con un vector control, que codificaba para el gen de la β-galactosidasa (LacZ) o de la proteína verde (Enhanced Green Fluorescence Protein (EGFP)). En el caso de la proteína EGFP, se realizó la monitorización de la infección mediante la detección de la fluorescencia en un microscopio

óptico (Leica DMR). Mientras que en el caso de la proteína LacZ se detectó la actividad β -galactosidasa in vitro, utilizando como sustrato X-gal. Se recogieron los islotes mediante la centrifugación a 814 g durante 2 min, se descartó el sobrenadante y se les añadieron 100 μ l de solución de fijación (Glutaraldehído 1:500 con PBS), incubándolos durante 10 min a temperatura ambiente. Se volvieron a centrifugar, lavandolos con PBS 1x y dejandolos después en PBS 1X durante 10 min a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo, se volvieron a lavar los islotes con PBS 1X. Finalmente se realizó la tinción con 200 μ l de X-gal por pozo de placa de 24 pozos (20 μ l $K_3Fe(CN)_6$ 250 mM, $K_4Fe(CN)_6$ 250 mM, 0,4 μ l $MgCl_2$ 1 M, 5 μ l X-gal 40 mg/ml disuelto en N N' dimetilformamida, PBS) durante toda la noche a 37°C. Las células se volvían de color azul entre la primera y la décimoquinta hora de incubación. Se cuantificó el n° de islotes infectados, mediante la observación al microscopio de luz visible de los islotes de color azul.

7.3.1 Medición de la proliferación de los islotes humanos infectados con vectores lentivirales

Una vez infectados los islotes y transcurridas las primeras 24 h desde que se había añadido el medio 5,5 mM glucosa, los islotes se separaron en dos grupos, uno se incubó a 5,5 mM glucosa y el otro a 11,1 mM glucosa durante 48 h. Posteriormente se añadió hidroxipiurea al cultivo, a una concentración final de 12,5 mM durante 24 h. La hidroxipiurea ayuda a sincronizar el cultivo, ya que detiene las células en fase G1 del ciclo celular. Se realizaron 5 lavados con HBSS y se volvieron a dejar los islotes en cultivo en las mismas condiciones de glucosa que estaban antes del lavado. Transcurridas 3 horas, se añadió timidina tritiada (3H -Timidina) (10 μ Ci/ml) y se dejaron incubando los islotes durante 1 h. Transcurrida 1 h, los islotes se extrajeron de la placa y se dejaron en otra placa con HBSS, donde con la ayuda de una lupa binocular y una pipeta automática, se contaron el número exacto de islotes recuperados y se congelaron como precipitado seco a -80°C.

7.3.2 Cuantificación de la 3H -Timidina incorporada

Para la cuantificación de la 3H -Timidina incorporada se utilizó el *Sampling Manifold* (Millipore). Se resuspendieron los islotes en 250 μ l de agua destilada, se sonicaron 5 veces (potencia 10 vatios) durante 10 s y se alicuotaron en 3 tubos con 50 μ l cada uno. Los 50 μ l restantes se congelaron a -80°C. A cada tubo se añadieron 500 μ l de ácido tricloroacético (TCA) frío al 5%. El contenido de cada eppendorf se filtró con una bomba de vacío, haciendo pasar la muestra a través de un filtro de 25 mm de diámetro (Glass microfibre filters).

Whatman®) de forma que los islotes quedaran retenidos en el filtro. Se lavaron los filtros 3 veces con agua destilada, recogiénolos posteriormente y poniéndolos en un vial con 10 ml de líquido de centelleo. Se contaron los niveles de ^3H retenido en el filtro con un contador β , como indicador directo de la ^3H -timidina incorporada.

7.4 Niveles de GLUT2 en islotes humanos infectados con partículas lentivirales

Para evaluar los niveles de GLUT 2 (transportador de glucosa de tipo 2), se aplicó la técnica de citometría de flujo. Transcurridos 3 días desde la infección, se disgregaron totalmente los islotes en células sencillas. Para ello, se sometieron los islotes a 3 lavados con PBS y posteriormente se incubaron a 37°C durante 5 min con una solución tripsina-EDTA (GIBCO) diluida 1:4 con HBSS. Se dejaron las muestras a 4°C durante 5 min para que se depositaran en el fondo las partes de islotes no disgregados, recuperando el sobrenadante que contenía las células ya disgregadas. Se añadió de nuevo la solución de tripsina-EDTA y se repitió el proceso 4 veces o hasta que no se observaron islotes sin disgregar. Las células en suspensión que se iban recuperando se mantenían en FBS al 100%. Al finalizar todos los ciclos de disgregación, se centrifugaron las células a 458 g durante 5 min y se marcó la membrana de las células con anticuerpo anti-GLUT2 (1:50 en HBBS-2% FBS) (Biogenesis) durante 20 min a 4°C. A continuación, se lavaron las células con HBBS 2% FBS y se incubaron con un anticuerpo secundario fluoresceinado (anti-conejo TRITC 1:50) (Jackson Immunoresearch. USA) durante 10 min a 4°C. Finalmente, se lavaron y resuspendieron las células en 200 μl de HBBS 2% FBS para leer la muestra en el citómetro de flujo (FACSCalibur, Becton Dickinson. USA). Los datos se analizaron con el programa de análisis Cellquest (Becton Dickinson. USA).

7.5 Determinación de la proliferación de la célula beta en islotes humanos infectados mediante inmunocitoquímica

Se infectaron los islotes como se ha descrito en el apartado 7.2.3 y se dejaron en cultivo en medio 11,1 mM glucosa. Transcurridos 3 días se añadió hidroxurea 12,5 mM durante 24 h. Al día siguiente, se lavaron los islotes con PBS 1X 3 veces, se dejaron en cultivo durante 3 h, se volvieron a realizar 3 lavados y a continuación se disgregaron los islotes (ver apartado 7.4). Las células individuales en suspensión obtenidas del proceso de disgregación, se depositaron sobre un porta aplicando un citospin (Thermo Shandon) a 500 rpm durante 10

min. A continuación, se fijaron las células con acetona durante 3min a -20°C y se lavaron 3 veces con PBS.

Dado que la proteína KI67 es nuclear, se realizó una permeabilización de las células con citrato 0,01 M pH=6 durante 5 min en el microondas a potencia máxima (3 veces), previo al marcado. Posteriormente se realizaron 3 lavados: PBS 1X durante 5 min, 1% tritón en PBS 1x durante 30 min y PBS 1X durante 5 min. Al finalizar los lavados se realizó el bloqueo con solución de dilución de anticuerpos (Antibody diluent. Dako Cytomation) con 3% de suero de burro durante 1 h a temperatura ambiente, a continuación se tiñeron las células durante toda la noche a 4°C con KI67 (Boehringer Mannheim) (1/100 en solución de bloqueo), el cual es marcador de núcleos de células en proliferación, y con anti-insulina (DakoCytomation) (1/1000 en solución de bloqueo). Al día siguiente, se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno con 0,01% tritón en PBS 1x y se marcaron las células con los anticuerpos secundarios respectivos durante 1 h a temperatura ambiente, anti-conejo de indias Cy2 (1/500 en solución de bloqueo) (Jackson Immunoresearch. USA) para el anticuerpo anti-insulina y anti-ratón Cy3 (1/500 en solución de bloqueo) (Jackson Immunoresearch. USA) para el anticuerpo anti-KI67 (Boehringer Mannheim. Alemania). Al finalizar la incubación, se lavaron las células 3 veces con 0,01% tritón en PBS 1x y se montaron las preparaciones con la solución de montaje (Fluorescence Mounting Medium. DakoCytomation) cubriendo después la muestra con un cubre.

Las preparaciones se observaron posteriormente en el microscopio de fluorescencia (Leica DMR).

8 Metodología utilizada para la caracterización de los ratones

Cdk4R24C NOD

8.1 Historia natural

Para el seguimiento de la incidencia de diabetes en los ratones NOD Cdk4 R24C, se dispuso a los ratones en grupos máximo de ocho por jaula, con genotipos diversos y separados por sexo, se les hizo una determinación de glicosuria por semana, desde la 8ª semana de edad hasta la 30ª semana. A los individuos con dos determinaciones consecutivas positivas para glucosa, se les midió la glicemia (Glucometer®. Bayer) y si ésta era positiva se procedió al sacrificio del animal por dislocación cervical, para análisis morfológicos y/o inmunohistoquímicos del tejido pancreático. Se consideró a un individuo diabético cuando los niveles de glicemia superaron los 200 mg/dl.

8.2 Transferencia adoptiva

Este ensayo consiste en la transferencia de un número determinado de linfocitos a ratones NOD/SCID y el estudio del efecto que esta transferencia tiene sobre la incidencia de diabetes en los ratones recipientes. Los ratones NOD/SCID, por si solos no desarrollan diabetes, dado que carecen de linfocitos T y B y, por tanto, son los linfocitos inyectados junto con la predisposición genética de la cepa NOD, los que pueden causar el desarrollo de la enfermedad. Se inyectaron diez millones de esplenocitos o linfocitos procedentes de nódulos linfáticos, previamente aislados conforme a lo descrito en el apartado 5.4 y 5.5, por vía intravenosa, a ratones NOD/SCID de 3-4 semanas de edad. Se estudió la incidencia de diabetes durante 12-16 semanas siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado 10.1.

8.3 Ensayos de proliferación linfocitaria por incorporación de Timidina-³H

Para los estudios de proliferación de células esplénicas o de nódulos linfáticos se usaron placas de 96 pocillos de fondo curvo. Primero se añadieron los antígenos frente a los cuales queríamos estudiar la respuesta de los linfocitos: insulina total recombinante humana (SIGMA), péptido insulina B12-25 (VEALYLVCGERGFF) y péptido GAD65p35 (SRLSKVAPVIKARMMMEYGTT), a una concentración final de 25 µg/ml. Como control positivo de proliferación, se utilizó el anticuerpo agonista anti-CD3 (clon 2CII. Becton Dickinson. USA) 1 µg/ml, estímulo policlonal de todas las células. A continuación se plaquearon 200.000 células por pozo en un volumen final de 200 µl. Se dejaron en cultivo a 37°C durante 72 h. Transcurrido este tiempo, se añadió timidina-³H, que se incorpora al ADN de las células en proliferación, y se dejó en cultivo durante 16 h. Al finalizar la incubación, se aspiraron las células con la ayuda de un equipo Cell-Harvester (Wallac. Finlandia) y se recogieron en un filtro (Printed FiltermatA. Wallac. Finlandia), se contó la emisión β debida al ³H incorporado a las células y recogida en un filtro, en un contador de centelleo de radiación β (Beta Plate (Wallac. Finlandia)).

8.4 Caracterización fenotípica de los linfocitos por citometría de flujo

La caracterización fenotípica de los linfocitos consiste en el análisis de los diferentes marcadores de membrana que presentan, mediante marcado con un anticuerpo unido directamente a un fluorocromo y posterior recuento y análisis por citometría de flujo.

Para la caracterización fenotípica, se realizó la purificación de los linfocitos, bien de bazo o bien de nódulos linfáticos pancreáticos, tal y como se describe en el apartado 5.4 y en el

apartado 5.5 respectivamente. Posteriormente se lavaron con tampón de citometría (HBSS-1% FBS), se resuspendieron a razón de 500.000 células por 100 µl de tampón de citometría y se incubaron con el reactivo Fc block (anti-CD32, CD16. Fcγ III/ii 2.4G2. Pharmingen. Becton Dickinson. USA) durante 20 min en hielo, para bloquear los receptores Fc comunes. A continuación se centrifugaron los linfocitos y se realizó el marcado con el o los anticuerpos de interés unidos a un fluorocromo (ver tabla III.5), durante 20 min a 4°C. Se mantuvieron un grupo de células sin marcar que se utilizaron como control negativo de tinción. Transcurrido el tiempo de incubación, se lavaron las células con tampón de citometría durante 5 min a 458 g a 4°C, y se resuspendió el precipitado con 200 µl de tampón de citometría para leer las muestras en el citómetro (FACSCALIBUR- Becton-Dickinson). El análisis de los resultados se realizó con el programa de análisis Cell-Quest (Becton Dickinson).

anticuerpo	concentración stock	dilución final	anticuerpo	concentración stock	dilución final
a-CD11B F	0,2mg/ml	1:100	a-CD69 PE	0,2mg/ml	1:100
a-CD11c PE	0,2mg/ml	1:100	a-CD8 APC	0,2mg/ml	1:500
a-CD19 F	0,5mg/ml	1:100	a-CTLA4	0,2mg/ml	1:100
a-CD25 APC	0,2mg/ml	1:100	a-F4/80 F	0,5mg/ml	1.100
a-CD3 F	0,5mg/ml	1:100	a-FAS PE	0,2mg/ml	1:100
a-CD4 F	0,5mg/ml	1:1000	a-IAd F	0,5mg/ml	1:100
a-CD4 PE	0,2mg/ml	1:1000	a-MAC-3 F	0,5mg/ml	1:100
a-CD62L F	0,5mg/ml	1:500			

Tabla III.5. Diluciones de los anticuerpos utilizados para la caracterización. F= FITC(fluoresceína isotiocianato); PE=ficoeritrina; APC= alofocianina.

8.5 Determinación del grado de infiltración linfocitaria de los islotes

Para determinar el grado de infiltración de los islotes, se fijaron los páncreas con formalina al 4% en PBS y posteriormente se incluyeron los páncreas fijados en parafina. A partir del bloque de parafina se realizaron cortes de 5 µm, que fueron contrastados con Hematoxilina/Eosina, una mezcla de un colorante básico y otro ácido respectivamente, que realizan una tinción diferencial de núcleo y citoplasma, que hace que el islote se diferencie claramente del resto del tejido.

Para cuantificar el nivel de infiltración del islote, se procedió a asociar un número al grado de infiltración (ver figura III.12), siendo:

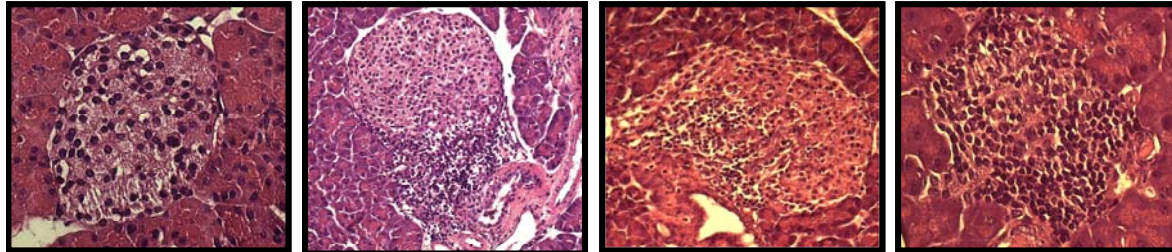
Nivel 0: Ausencia total de infiltración.

Nivel 1: Infiltración peripancreática.

Nivel 2: Menos de la mitad del área del islote infiltrada.

Nivel 3: Más de la mitad del área del islote infiltrada.

A partir de aquí, se observaron 6 animales por grupo y tres niveles distintos por animal, contabilizando en cada uno el número de islotes y su grado o nivel de infiltración (ver figura II.12).



Nivel 0

Nivel 1

Nivel 2

Nivel 3

Figura III.12. Muestra gráfica de los grados o niveles de infiltración.

8.6 Apoptosis

8.6.1 Determinación de los niveles de apoptosis mediante la técnica de TÚNEL (TdT-mediated dUTP nick-end labeling)

Para este ensayo se utilizó el kit ApoAlert®DNA Fragmentation Assay (Clontech). Durante el proceso de apoptosis (muerte programada de la célula), las endonucleasas celulares rompen el ADN del núcleo entre los nucleosomas, produciendo una mezcla de fragmentos de ADN de varias medidas entre 180-200 pb. Precisamente es este proceso de fragmentación el que se detecta mediante el kit ApoAlert®DNA Fragmentation Assay (Clontech). Este kit se basa en un enzima, la deoxinucleotidil transferasa terminal, que cataliza la incorporación de nucleótidos fluoresceinados a los extremos 3' hidroxilo de los fragmentos cortados de ADN.

En primer lugar se aplicó el kit ApoAlert®DNA Fragmentation Assay (Clontech) para detectar las células apoptóticas. En segundo lugar y para discernir si las células apoptóticas eran células beta, se introdujo una co-tinción con un anticuerpo anti-insulina (ICN). Se hizo un bloqueo (BSA al 3% en una solución de dilución de anticuerpos (ChemMate™ Antibody Diluent. DakoCytomation)) durante 1 h a temperatura ambiente, para evitar las uniones inespecíficas de los anticuerpos al tejido y a continuación se realizó el marcado con el anticuerpo de conejo de indias anti-insulina (Dakocytomation) (1:500 en solución de bloqueo) durante toda la noche a 4°C. Se realizaron 3 lavados con PBS1x de 5 minutos cada

uno. Después se marcó con un anticuerpo secundario fluoresceinado anti-conejo de indias Cy3 (1:500) diluido en solución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente. Se realizaron de nuevo 3 lavados de 5 minutos cada uno. A continuación, se hizo el montaje de la preparación con solución de montaje (Fluorescence Mounting Medium). Se observaron las muestras en el microscopio de fluorescencia (Leica DMR). Las células apoptóticas presentaron el núcleo verde y las células positivas para insulina el citoplasma rojo.

8.6.2 Ensayo de apoptosis por Anexina

La Anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos de forma dependiente de calcio que identifica las células apoptóticas [175]. Este compuesto se une a los fosfolípidos cargados negativamente de la superficie de la membrana plasmática, con elevada especificidad especialmente para las fosfatidilserinas. La presencia de fosfatidilserinas en la membrana externa de la célula sólo se da en procesos de apoptosis cuando en etapas tempranas de ésta y mediante un proceso de translocación, las fosfatidilserinas pasan de la cara interna a la externa de la membrana plasmática.

Para este ensayo se utilizó el kit Annexin apoptosis detection kit I (BD). Las muestras se adquirieron por el citómetro FACSCalibur (Becton Dickinson.USA) y los datos se analizaron con el programa de análisis CellQuest (Becton Dickinson.USA).

8.7 Determinación del grado de susceptibilidad a la apoptosis de los linfocitos mediante anticuerpo anti-CD3

La reestimulación de los linfocitos T vía complejo TCR/CD3 induce la muerte celular inducida por activación (Activation induced cell death (AICD)) [131]. AICD es la vía fisiológica mayoritaria que regula la homeostasis de las células T. En las células CD4 está mediada, en parte, por la interacción Fas-FasL, mediante la regulación de la expresión del FasL) [132]. La unión a membrana o la secreción de FasL provoca su unión a los receptores Fas en la misma célula o en la célula vecina para activar la cascada de señalización de muerte celular [131].

Se sembraron 2 millones de linfocitos por pozo en un volumen final de 2 ml en placas de 6 pozos. Se realizaron 2 condiciones, una sin estímulo policlonal y la otra con el anticuerpo anti-CD3 soluble (Becton Dickinson. USA) como estímulo activador policlonal a una concentración final de 1 µg/ml. Se realizaron incubaciones a distintos tiempos (0 h, 16 h y 40 h). Se recogieron las células y se marcaron primero con los anticuerpos anti-CD8 APC

(Pharmingen. Becton Dickinson. USA) y anti-CD4 PE (Pharmingen. Becton Dickinson. USA) (ver apartado 8.4) y después se realizó el ensayo de apoptosis mediante el kit deAnexina (ver apartado 8.6.2). Se añadieron, como control positivo de apoptosis, células de la misma muestra irradiadas a 2500 rads teñidas del mismo modo.

8.8 Ensayo de WESTERN BLOT para la detección de los niveles de la proteína GFAP

8.8.1 Extracción de proteínas a partir de tejido

Esta técnica sirve tanto para tejido fresco, como para tejido congelado en N₂ líquido.

La extracción de proteínas debía hacerse siempre en frío para no degradar las proteínas. Se dejó la punta del politrono durante toda la noche en una solución NaOH 0,9M, para eliminar restos de tejido anterior. Justo antes de empezar el proceso de extracción, se lavó la punta del politrono con agua, haciendo varios pulsos de 5s, y posteriormente se homogeneizaron los tejidos sumergidos en tampón de homogeneización (ver tabla III.6) (1 ml de tampón por cada 100 mg de tejido) en un tubo de fondo redondeado. Se realizaron 3 pulsos de 5 s cada uno por muestra, posteriormente se dejaron los tubos a 4°C 30 min y luego se centrifugaron a 4°C a 20800 g durante 30 min adicionales. El sobrenadante así obtenido era ya el extracto de proteínas. Al terminar de politronear y entre muestra y muestra, se debía limpiar el politrono con solución 0,9M de NaOH y después con agua destilada, para evitar contaminaciones entre muestras.

Para cuantificar las proteínas se usó el método DCTM de *BIO-RAD*.

Componentes	Concentración
Hepes	50mM
TritónX-100	1%
Pirofosfato sódico	50mM
Fluoruro sódico	0,1 M
o-vanadato sódico	10mM
Inhibidores de proteasas	10X

Tabla III.6. Tampón de homogeneización de tejido para la extracción de proteínas.

8.8.2 Electroforesis de las proteínas

Para la electroforesis se usaron geles de acrilamida al 10% Bis-Tris Novex de NuPAGE®(Invitrogen). Se cargaron 50 µg de proteína en tampón de carga (NuPage LDS Sample Buffer, Invitrogen) por pozo, previamente hervidas a 70°C durante 10 min y marcador de peso molecular (High Range Rainbow Molecular Weight Marker, Amersham Biosciences). La electroforesis se corrió durante 50 min a 200 V.

8.8.3 Transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa

Al finalizar la electroforesis se montó el dispositivo para la transferencia húmeda. Todo el material utilizado debía estar empapado en tampón de transferencia (para 1 l: 3 g TRIS pH=8,5, 14,18 g glicina, 200 ml metanol, 2,5 ml SDS 20%) y la membrana (PVDF Transfer Membrane, Perkin Elmer, USA), previamente activada con metanol. Al montar el gel había que ir con cuidado de no generar burbujas que podían interferir en el proceso de transferencia.

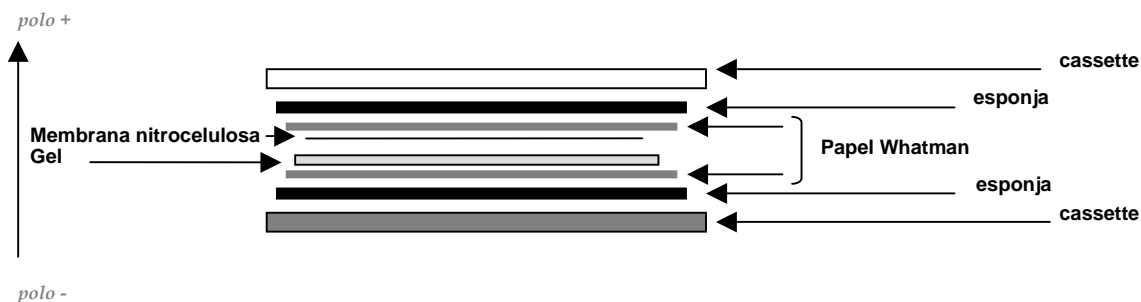


Figura III.13. Esquema montaje del dispositivo de transferencia.

La transferencia se efectuó durante 90 min a 250 mA a 4°C o alternativamente, durante toda la noche a 30V.

Para comprobar si la transferencia había ido bien, se miraba si el marcador de pesos moleculares coloreados coloreaba la región de la membrana correspondiente a su peso. Además se teñía el gel con Comassie Blue durante 30 min y se desteñía luego con una solución desteñidora (7,5% ácido acético, 7,5% isopropanol). Si la transferencia había ido bien, el gel quedaba completamente desteñido. Si quedaba alguna proteína por transferir, ésta quedaba teñida de color azul.

8.8.4 Bloqueo de la membrana

Una vez transferidas las proteínas a la membrana se bloquearon las membrana con solución de bloqueo (TBS, Tween 0,05%, 5% leche en polvo) durante 1 h a temperatura ambiente.

8.8.5 Detección de la proteína GFAP

Se diluyó el anticuerpo anti-GFAP (Proteína Glial Fibrilar Ácida) (DAKO) 1:10000 en solución de bloqueo y se incubó la membrana durante toda la noche a 4°C y en agitación con el anticuerpo. Al día siguiente, se lavó la membrana 3 veces durante 5 min en agitación con TBS-Tween y se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo peroxidado (Dako) durante 1 h a temperatura ambiente. Después se lavó dos veces con TBS-Tween durante 5 minutos y una última vez con TBS. A continuación se incubó la membrana durante 1min con el sustrato quimioluminiscente de la peroxidasa (enhanced chemiluminescence (ECL)) (10 ml Tris 100 mM pH=8,5, 25 µl ácido cumárico, 50 µl luminol, 3 µl agua oxigenada al 35%) y se expuso la membrana a la película autoradiográfica el tiempo necesario.

9 Estadística

En la presente tesis, se ha utilizado el test estadístico de la t de Student, excepto en el experimento de proliferación de los islotes pancreáticos humanos por incorporación de ³H-timidina, que se utilizó el test Anova y en el experimento de proliferación de la célula β de los islotes pancreáticos infectados con partículas lentivirales mediante co-tinción por inmunocitoquímica con KI67 e insulina, que se utilizó el test de Fischer.