



FACULTAT  
DE CIÈNCIES, TECNOLOGIA  
I ENGINYERIES

UVIC | UVIC-UCC

Trabajo de Fin de Grado Experimental

# EL RECEPTOR DE LA VITAMINA D RETRASA EL ENVEJECIMIENTO DEL PÁNCREAS ENDOCRINO

IMAN MATTAR

**Grado en Biotecnología**

Tutora: Alba Casellas Comallonga

Cotutora: Estefania Casaña i Lorente

Vic, junio de 2022

# Agradecimientos

La realización de este trabajo ha significado el cierre de una gran etapa para mí. Una etapa en la que he estado acompañada por un gran número de personas que, sin ellas, no habría sido lo mismo y por ello, os quiero agradecer a todos y todas por haber estado allí.

Primero que todo, agradecerte a ti, Alba, por toda la confianza depositada en mí, por toda la ayuda que me has ofrecido, por toda la paciencia que has tenido, por todo el entusiasmo y por todo el conocimiento que me has aportado sobre la maravillosa vitamina D y su receptor. Habría sido difícil haber encontrado a una profesora mejor que tú para realizar este trabajo.

También agradecer a todas las personas que forman el CBATEG por haberme ayudado y permitido realizar este trabajo, tratándome y acogiéndome tan bien. En especial, quiero darle las gracias a Estefanía por haber sido la mejor tutora externa y haberme enseñado tanto sobre el mundo de los islotes.

Después, agradecer toda la enseñanza que me ha proporcionado el profesorado de la UVic a lo largo de estos cuatro años y por estar siempre dispuestos a ayudar.

Darle las gracias a la persona que me empujó a hacer este trabajo, Aina, ya que fue la ilusión y motivación en tu trabajo lo que hizo que yo esté aquí, escribiendo esta memoria.

Muchas gracias a mis chicas de Vic, Gala, Nidia, Giulia, Danna y Manuel. Sin vosotras no habría podido disfrutar de esta experiencia como lo he hecho, estando en los momentos buenos y en los malos.

Por último, agradecerle a mi familia, en concreto, a mis padres por apoyarme y quererme de manera incondicional, porque no habría llegado tan lejos sin vosotros. También os doy las gracias a vosotras, Dunia y Sabrin, por aguantar a esta hermana mayor. Y no me olvido de ti, Adam, que a pesar de que ya no estés con nosotros, siempre te siento presente.

# Resumen

**Título:** *El receptor de la vitamina D retrasa el envejecimiento del páncreas endocrino.*

**Autora:** Iman Mattar

**Cotutoras:** Dra. Alba Casellas Comallonga (CIBER-CBATEG) y Dra. Estefania Casaña i Lorente (CBATEG)

**Fecha:** Junio de 2022

**Palabras clave:** Diabetes de tipo 2, T2D, envejecimiento, desdiferenciación, VDR, islote pancreático, célula beta.

La diabetes de tipo 2 (T2D) es una enfermedad metabólica en la que el organismo no es capaz de mantener la homeostasis de la glucosa debido a una mala funcionalidad de las células beta pancreáticas. Está causada por varios factores como la obesidad, el estilo de vida sedentario y el envejecimiento. De hecho, el envejecimiento se ha asociado con la desdiferenciación celular<sup>1</sup> y hay estudios que sugieren que una de las causas de la T2D es el mecanismo de desdiferenciación, origen de la pérdida de la funcionalidad en las células beta pancreáticas<sup>2-4</sup>. Por otro lado, se ha descrito que la vitamina D, junto con su receptor (VDR), tiene un efecto protector en la desdiferenciación de las células beta y a su vez, frente a la aparición de la T2D<sup>5,6</sup>. Es por ello, que en este estudio hemos tratado de estudiar el papel del VDR durante el envejecimiento del islote pancreático, mediante el análisis de los cambios en el perfil de expresión en el islote con la edad. Los resultados sugieren que VDR puede tener un efecto protector del páncreas endocrino durante el envejecimiento, retrasando la pérdida del fenotipo y de la funcionalidad de las células del islote.

# Summary

**Title:** *Vitamin D receptor retards endocrine pancreas aging.*

**Author:** Iman Mattar

**Supervisor:** Dra. Alba Casellas Comallonga (CIBER-CBATEG) and Dra. Estefania Casaña i Lorente (CBATEG)

**Date:** June 2022

**Keywords:** Type 2 diabetes, T2D, aging, dedifferentiation, VDR, pancreatic islet, beta cell

Type 2 diabetes (T2D) is a metabolic disease in which the organism is unable to maintain glucose homeostasis due to malfunctioning pancreatic beta cells. It is caused by several factors such as obesity, a sedentary lifestyle and aging. In addition, aging has been associated with cellular dedifferentiation<sup>1</sup> and studies suggest that one of the causes of T2D is the dedifferentiation mechanism that leads to loss of functionality in pancreatic beta cells<sup>2-4</sup>. On the other hand, it has been described that vitamin D, through the vitamin D receptor (VDR), has a protective effect on the beta cell dedifferentiation and, in turn, against the onset of T2D<sup>5,6</sup>. Therefore, in this study we have attempted to study the role of VDR during pancreatic islet aging by the analysis of changes in its gene profile expression. The results suggest that VDR may have a protective effect on the endocrine pancreas during aging, delaying the loss of islet cell phenotype and functionality.

# Índice de Contenidos

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1. Páncreas.....	1
1.1.1. Estructura y función .....	1
1.1.2. Páncreas exocrino .....	1
1.1.3. Páncreas endocrino.....	1
1.1.4. Formación y desarrollo del páncreas endocrino.....	2
1.2. Envejecimiento y desdiferenciación.....	4
1.3. Vitamina D .....	4
1.3.1. Receptor de la vitamina D .....	5
1.3.2. Ratones transgénicos VDR .....	6
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>7</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>8</b>
3.1. Animales .....	8
3.1.1. Consideraciones Éticas .....	8
3.2. Diseño del estudio .....	8
3.3. Aislamiento de islotes pancreáticos .....	10
3.4. Extracción de RNA .....	10
3.5. Síntesis de cDNA.....	10
3.6. Cuantificación de la expresión.....	11
3.7. Análisis estadístico.....	12
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>13</b>
4.1. Obtención de islotes pancreáticos. ....	13
4.2. Extracción de RNA de islotes pancreáticos .....	13
4.3. Estudio del cambio en el perfil de expresión del islote pancreático con la edad .....	14
4.3.1. Análisis de la expresión de genes claves en el fenotipo de la célula beta pancreática.....	14
4.3.2. Análisis de la expresión de genes precursores del fenotipo de la célula beta ..	15
4.3.3. Análisis de la expresión de genes que forman la maquinaria celular implicada en la funcionalidad de la célula.....	16
4.3.4. Análisis de la expresión de genes implicados en el mantenimiento de la identidad de la célula alfa.....	16

4.4.	Estudio del efecto de VDR en el mantenimiento del islote pancreático .....	17
4.4.1.	Análisis de la expresión de genes involucrados en el fenotipo de la célula beta pancreática en ratones transgénicos .....	18
4.4.2.	Análisis de la expresión de genes precursores del fenotipo de la célula beta en ratones transgénicos .....	19
4.4.3.	Análisis de la expresión de la maquinaria celular implicada en la funcionalidad de la célula beta en ratones transgénicos. ....	19
4.4.4.	Análisis de la expresión de genes implicados en el mantenimiento de la identidad de la célula alfa.....	20
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>22</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIÓN.....</b>	<b>24</b>
6.1.	Limitaciones y mejoras para realizar en proyectos futuros .....	24
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>26</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>.....</b>	<b>i</b>
<b>ANEXO B.....</b>	<b>.....</b>	<b>iii</b>
<b>ANEXO C.....</b>	<b>.....</b>	<b>v</b>

# Lista de Tablas

<i>Tabla 1. Cebadores utilizados en la qPCR para el análisis de la expresión de los islotes pancreáticos. ....</i>	<i>11</i>
<i>Tabla 2. Reactivos utilizados en la qPCR para el análisis de expresión. ....</i>	<i>12</i>
<i>Tabla 4. Resultados recogidos de la obtención de islotes pancreáticos. ....</i>	<i>13</i>
<i>Tabla 5. Ejemplos de la calidad, integridad y concentración del RNA extraído. ....</i>	<i>14</i>

# Lista de Figuras

<i>Figura 1. Ilustración del páncreas .....</i>	<i>2</i>
<i>Figura 2. Formación y desarrollo del páncreas endocrino .....</i>	<i>3</i>
<i>Figura 3. Diferenciación de la célula endocrina progenitora en célula alfa y beta .....</i>	<i>4</i>
<i>Figura 4. Síntesis de la vitamina D y acciones en el organismo .....</i>	<i>5</i>
<i>Figura 5. Mecanismos de acción genómicos y bioquímicos de VDR dentro de la célula .....</i>	<i>6</i>
<i>Figura 6. Esquema del diseño experimental .....</i>	<i>9</i>
<i>Figura 7. Análisis de la disminución de la expresión de genes claves en el fenotipo de la célula beta durante el envejecimiento en ratones controles.....</i>	<i>14</i>
<i>Figura 8. Análisis de la pérdida de expresión de genes precursores del fenotipo de la célula beta durante el envejecimiento en ratones controles .....</i>	<i>15</i>
<i>Figura 9. Análisis de la disminución en la expresión de genes implicados en la funcionalidad de la célula beta durante el envejecimiento en ratones controles .....</i>	<i>16</i>
<i>Figura 10. Análisis de la pérdida en la expresión de genes implicados en el mantenimiento de la identidad de la célula alfa durante el envejecimiento en ratones controles .....</i>	<i>17</i>
<i>Figura 11. Análisis de la sobreexpresión de VDR en ratones transgénicos .....</i>	<i>18</i>
<i>Figura 12. Análisis del cambio en la expresión de genes claves en el fenotipo de la célula beta durante el envejecimiento en ratones transgénicos .....</i>	<i>18</i>
<i>Figura 13. Análisis de la de expresión de genes precursores del fenotipo de la célula beta durante el envejecimiento en ratones transgénicos .....</i>	<i>19</i>
<i>Figura 14. Análisis de la disminución en la expresión de genes implicados en la funcionalidad de la célula beta durante el envejecimiento en ratones transgénicos.....</i>	<i>20</i>
<i>Figura 15. Análisis de la pérdida en la expresión de genes implicados en el mantenimiento de la identidad de la célula alfa durante el envejecimiento en ratones transgénicos.....</i>	<i>20</i>



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Páncreas

El páncreas es una glándula mixta formada por una parte exocrina y otra endocrina. En él se producen diversas hormonas y enzimas, que intervienen tanto en el proceso de digestión como en la regulación de los niveles de glucosa en sangre<sup>7</sup>.

### 1.1.1. Estructura y función

En humanos el páncreas se localiza cerca del estómago, transversalmente entre el duodeno a la derecha y el bazo a la izquierda. Este órgano se divide en tres partes diferentes: la cabeza, el cuerpo y la cola. La cabeza se encuentra en la región del duodeno con forma de C, en contraste con el cuerpo y la cola que se sitúan desde el asa C del duodeno hasta el bazo<sup>8</sup>. En ratones, la estructura del páncreas no está bien definida<sup>9</sup>.

El páncreas se puede distinguir en dos tejidos diferentes: el páncreas endocrino, tejido que será nuestro principal foco de estudio, formado por los islotes de Langerhans, que son productores de hormonas como la insulina y el glucagón; y el páncreas exocrino, compuesto por los acinos pancreáticos y el sistema ductal, que en conjunto secretan enzimas digestivas. La mayor parte del páncreas está conformada por el componente exocrino de la glándula y en menor proporción, por el componente endocrino<sup>10,11</sup>.

### 1.1.2. Páncreas exocrino

El páncreas está compuesto entre un 80 y un 85 % por tejido exocrino, el cual configura el páncreas exocrino. El páncreas exocrino lo forman dos tipos celulares principales: las células acinares y las células ductales. Este responde a la señal de ingesta sintetizando y secretando un gran conjunto de enzimas capaces de degradar carbohidratos, lípidos y proteínas<sup>8,10,12</sup>, esenciales para la digestión.

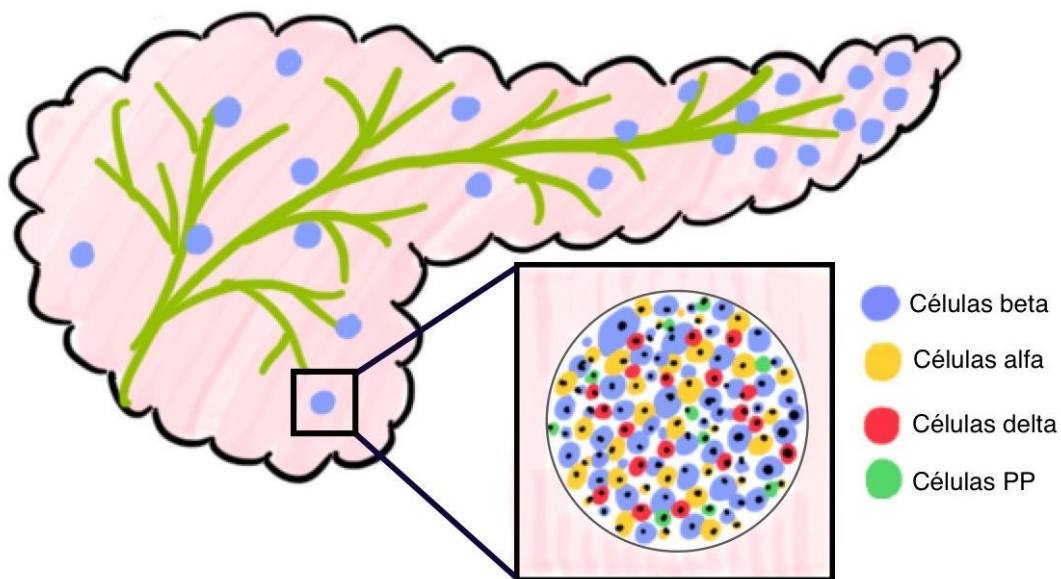
### 1.1.3. Páncreas endocrino

El páncreas endocrino en humanos representa entre el 1-2% de la glándula y está formado por los islotes de Langerhans, los cuales son agrupaciones de células endocrinas que conforman poblaciones de 1000-3000 células. Los islotes pancreáticos son los encargados de secretar diferentes hormonas que regulan la homeostasis de la glucosa. Dentro de estas agrupaciones podemos encontrar diferentes tipos celulares como son las células  $\alpha$ , las  $\beta$ , las  $\delta$  y las PP<sup>7,8,13</sup> (figura 1).

Las células  $\beta$  abarcan alrededor del 70-80 % del islote de Langerhans en ratones y aproximadamente un 55 % en humanos. En condiciones de concentraciones crecientes de glucosa, las células  $\beta$  liberan insulina al torrente sanguíneo en respuesta a este estímulo. Posteriormente, la insulina coordina la glucosa hacia los distintos tejidos, volviendo a las condiciones basales de glucemia<sup>13</sup>.

Las células  $\alpha$  comprenden en torno a un 20 % del islote pancreático en ratones y hasta un 40% en humanos. Estas células son las encargadas de la síntesis de glucagón, el cuál es una hormona que se secreta en respuesta a niveles bajos de glucosa en sangre (hipoglucemia). El glucagón se encarga de activar vías de síntesis de glucosa como la glucogenólisis y la gluconeogénesis<sup>11,13</sup>.

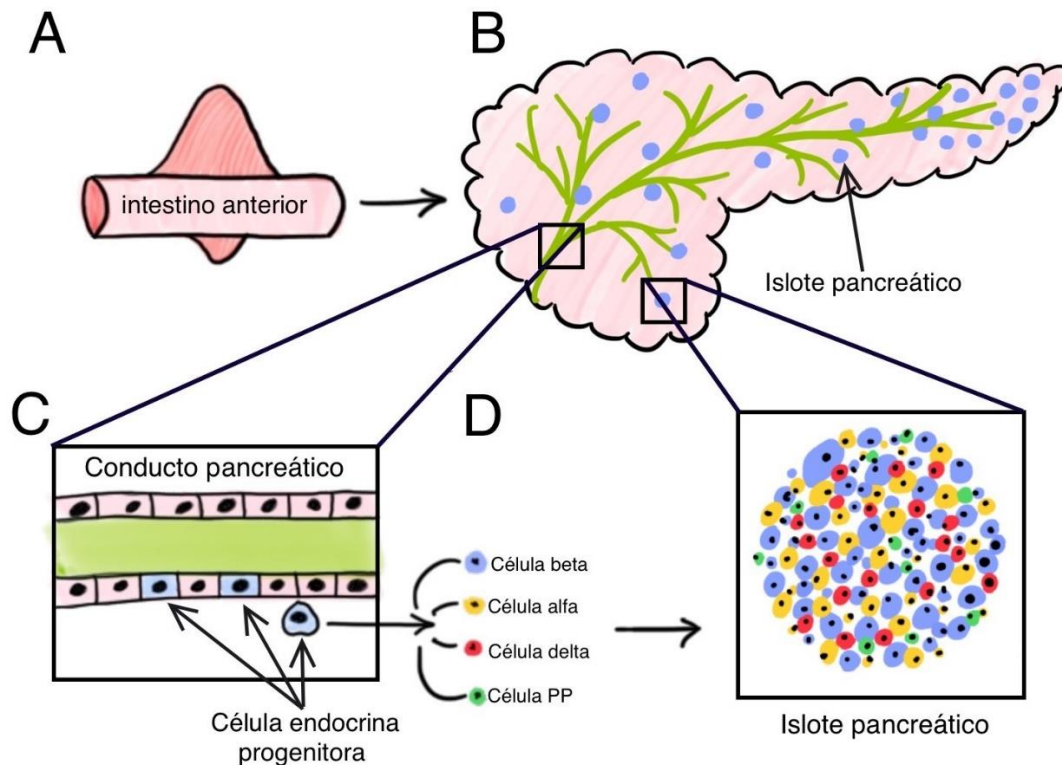
En un menor porcentaje, encontramos a las células  $\delta$  y a las células PP que representan cerca de un 10 % y un 1% del islote, respectivamente. Las células  $\delta$  son productoras de somatostatina, implicada en la regulación de la secreción hormonal de las células  $\beta$  y  $\alpha$ ; y las células PP, secretoras del polipéptido pancreático que colabora en el proceso de digestión<sup>13</sup>.



**Figura 1. Ilustración del páncreas.** La mayor parte del páncreas está formada por tejido exocrino. Los islotes de Langerhans se encuentran, marcados en azul, esparcidos por el órgano y se concentran en la cola del páncreas. El islote pancreático lo componen varios tipos celulares. (Fuente propia)

#### 1.1.4. Formación y desarrollo del páncreas endocrino

La formación del páncreas se divide en dos fases. En la primera fase, a partir del intestino anterior, se produce la evaginación epitelial del endodermo (figura 2A). Simultáneamente, se produce la neogénesis de células endocrinas progenitoras que generaran las células  $\alpha$  y  $\beta$  de los islotes de Langerhans. En la segunda fase, es cuando se empieza a diferenciar el tejido exocrino formando las estructuras de microlumen y los conductos que se distribuirán a lo largo del páncreas formando una red (figura 2B). Es en los conductos, donde se generan las células endocrinas progenitoras y estas se diferenciarán en uno de los distintos tipos de célula endocrina del islote (figura 2C). Posteriormente, los distintos tipos celulares que conforman el páncreas endocrino se agrupan formando los islotes pancreáticos<sup>14,15</sup> (figura 2D).



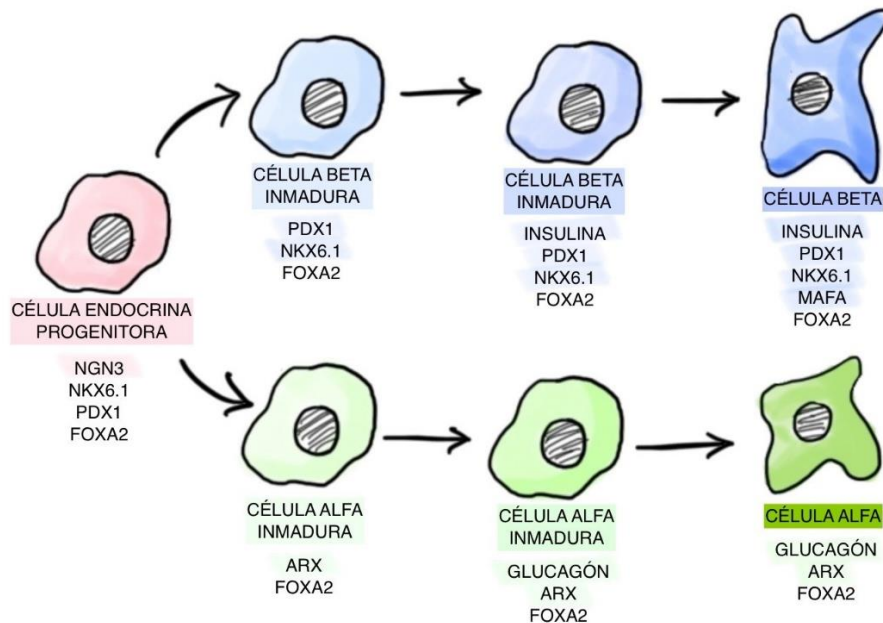
**Figura 2. Formación y desarrollo del páncreas endocrino.** A) Evaginación epitelial del endodermo del intestino anterior. B) Desarrollo del páncreas exocrino y endocrino. C) Formación de las células endocrinas progenitoras a partir de los conductos pancreáticos y posterior diferenciación. D) Agrupación de las células endocrinas diferenciadas en islotes. (Fuente propia)

Las células endocrinas progenitoras se diferencian en células especializadas según la expresión génica que adopten (figura 3). En la formación temprana del páncreas las células endocrinas progenitoras expresan diferentes factores de transcripción y el más característico de ellos es la *neurogenin 3* (NGN3)<sup>16</sup>. La expresión de NGN3 es determinante para la formación del páncreas endocrino y su especialización, y la falta de este factor se traduce en la ausencia de islotes pancreáticos. Durante la formación del órgano, la expresión del factor de transcripción *pancreatic and duodenal homeobox 1* (PDX1) también tiene un papel importante ya que se ha descrito que una pérdida de este factor durante el desarrollo conduce a la no formación del páncreas<sup>17</sup>. Así mismo, se ha descrito que el factor de transcripción *NK6 homeobox 1* (NKX6.1), en esta primera etapa, actúa segregando el linaje de las células pancreáticas exocrinas y endocrinas<sup>18</sup>. De igual manera, encontramos una expresión temprana de *forkhead box A2* (FOXA2) durante el desarrollo del páncreas<sup>19,20</sup>.

Concretamente, a lo que refiere a la diferenciación de las células  $\beta$ , dos marcadores importantes son PDX1, factor que marca el inicio de la transcripción de la insulina, y *v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein A (avian)* (MafA), que también interviene en la producción de insulina. En las células  $\beta$ , la expresión de NKX6.1 y PDX1 es necesaria para reprimir la síntesis de glucagón, el cual es exclusivo de las células  $\alpha$ . El factor FOXA2 activa la transcripción de PDX1 por lo que es importante para el mantenimiento de la célula<sup>17-20</sup>.

Por otro lado, en cuanto a la diferenciación de las células  $\alpha$ , *aristaless related homeobox* (ARX) es un factor de transcripción importante para determinar el fenotipo de las células  $\alpha$ , ya

que su ausencia da lugar a que no se desarrolle este tipo celular. Además, la expresión de FOXA2 en estas células es necesaria porque promueve la expresión de pre-glucagón<sup>19-22</sup>.



**Figura 3. Diferenciación de la célula endocrina progenitora en célula alfa y beta.** La expresión de factores de transcripción durante la diferenciación a célula alfa y célula beta. Los factores de transcripción más importantes en cada fase se encuentran subrayados.

## 1.2. Envejecimiento y desdiferenciación

El envejecimiento refleja una pérdida general de la funcionalidad del organismo, que en parte viene originada por la desdiferenciación que tiene lugar en los tejidos específicos. Un ejemplo de enfermedad en el que la edad es un factor importante es la diabetes de tipo 2 (T2D)<sup>1,23</sup>.

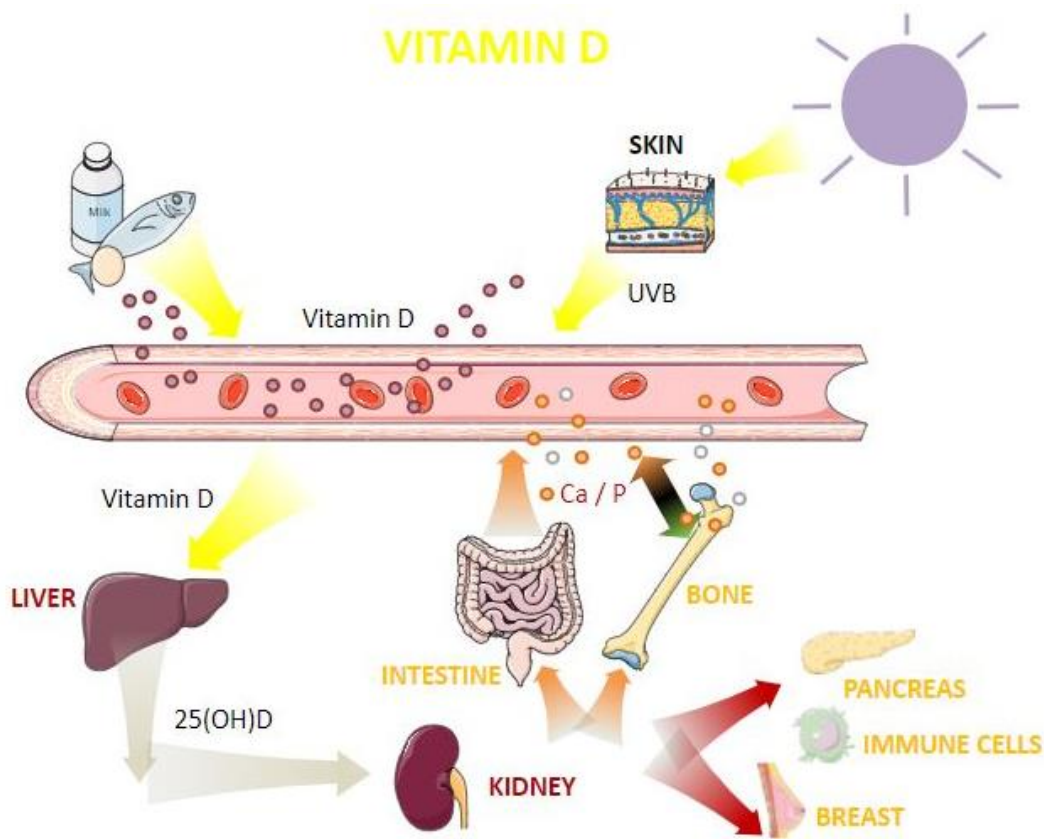
La diabetes de tipo 2 es una enfermedad metabólica en la que el organismo no es capaz de mantener la homeostasis de la glucosa debido a una mala funcionalidad del páncreas endocrino; concretamente, a una deficiente respuesta de las células beta pancreáticas a la hora de secretar insulina lo que causa condiciones de hiperglicemia.

En la literatura se ha descrito que la T2D es consecuencia, entre otras, de la desdiferenciación de las células beta pancreáticas ya que pasan a tener una secreción insuficiente de insulina<sup>3,4</sup>. En consecuencia, el envejecimiento puede ser una de las causas de la desdiferenciación de las células beta, las cuales pierden su perfil de expresión y funcionalidad provocando la aparición de T2D.

## 1.3. Vitamina D

La vitamina D es una vitamina liposoluble que se obtiene principalmente de la producción del propio cuerpo, concretamente en la piel. Además de producirse en el cuerpo, también se puede conseguir a partir del consumo de alimentos, donde la vitamina se encuentra inactiva. La vitamina D se sintetiza durante la exposición de los rayos ultravioletas, provenientes de la luz

solar, los cuales entran en contacto con la piel transformando al 7-dehidrocolesterol (colecalfiferol). Esta es una conformación inactiva de la vitamina D que, tras ser sintetizada por la piel, pasa por el hígado y el riñón donde sufre sucesivas transformaciones para convertirse en la forma activa 1- $\alpha$ -25- dihidroxivitamina D3 (calcitriol)<sup>24</sup> (figura 4).



**Figura 4. Síntesis de la vitamina D y acciones en el organismo.** (Fuente propia)

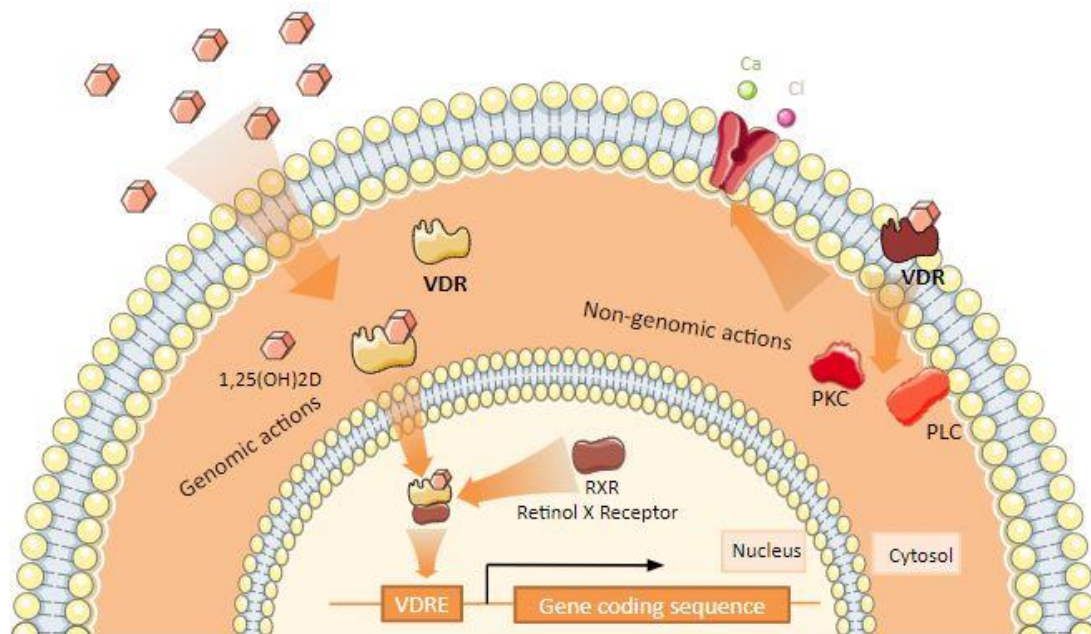
La organización mundial de la salud (OMS) ha destacado que un 40% de la población europea presenta deficiencia de vitamina D y un 13% una insuficiencia severa. Además, la deficiencia de esta vitamina es más común en personas de edad avanzada debido a que su cuerpo no recibe la exposición necesaria de luz solar y es poco eficiente a la hora de sintetizar calcitriol. La deficiencia de vitamina D está asociada a un gran número de enfermedades y trastornos de salud como: las enfermedades crónicas, inflamatorias, alergias, cáncer, infecciones, trastornos mentales, enfermedades neurodegenerativas y autoinmunes. Entre estas enfermedades, se ha visto que la deficiencia de la vitamina D está asociada al hecho de padecer diabetes de tipo I y/o diabetes de tipo 2<sup>24,25</sup>.

### 1.3.1. Receptor de la vitamina D

La vitamina D ejerce sus acciones uniéndose a su correspondiente receptor llamado VDR y es este, quien actúa dentro de la célula en mecanismos genómicos y bioquímicos. En consecuencia, es igual de necesario que haya un nivel adecuado de vitamina D como de VDR. El receptor de la vitamina D pertenece a la familia de receptores de hormonas esteroideas y se encuentra en la mayoría de las células de nuestro cuerpo, donde regula procesos celulares como la proliferación, la diferenciación, la apoptosis y la inmunomodulación. Anteriormente, solo se

había visto que VDR, tras unirse la vitamina D, se translocaba al núcleo, activando y reprimiendo la expresión génica. Actualmente, se ha observado que VDR también se puede colocar en la membrana, actuando como receptor de membrana y accionando mecanismos bioquímicos<sup>24</sup> (figura 5).

Se ha descrito que mutaciones en VDR se han asociado con el riesgo de padecer diabetes de tipo 2 en diferentes poblaciones y a raíz de esto se ha planteado la hipótesis de que la vitamina D y VDR pueden tener un papel protector en la T2D. También, recientemente se ha publicado un estudio en el que se destaca el efecto protector de la vitamina D frente a la desdiferenciación de la célula beta bajo un estrés hiperglicémico<sup>6</sup>.



**Figura 5. Mecanismos de acción genómicos y bioquímicos de VDR dentro de la célula.** (Fuente propia)

### 1.3.2. Ratones transgénicos VDR

Con el objetivo de estudiar los mecanismos de acción de la vitamina D en la célula beta pancreática y sus efectos en procesos fisiológicos o patofisiológicos como la diabetes se generaron ratones transgénicos que sobreexpresan el gen de VDR bajo el control del promotor de la insulina, dirigiendo así la expresión únicamente en la célula beta pancreática. Los ratones transgénicos se generaron introduciendo el constructo quimérico, formado por el gen de VDR y el promotor RIP (*Rat Insulin Promoter*) para que de esta forma solo se sobreexpresara VDR en las células beta pancreáticas, mediante la microinyección directa del pronúcleo masculino de un ovocito fecundado.

Los ratones transgénicos-VDR presentan un fenotipo normal sin aparentes diferencias respecto a sus hermanos controles, pero que denotan una clara mejora frente a ratones controles en un proceso diabético<sup>5,6</sup>.

## 2. OBJETIVOS

La Organización de las Naciones Unidas (ONU) ha planteado 17 Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) a realizar antes del 2030. Estos objetivos buscan eliminar las desigualdades entre personas, conseguir una vida digna para todas las personas y cuidar del planeta. En este Trabajo de Fin de Grado hemos querido aportar nuestro grano de arena teniendo en cuenta la incorporación de alguno de los ODS, concretamente, el objetivo de salud y bienestar que busca garantizar una vida sana y promover el bienestar para todas las personas en todas las edades.

La diabetes de tipo 2 (T2D) es una enfermedad multifactorial de impacto epidemiológico que está estrechamente relacionada con la obesidad y la edad<sup>26</sup>. Recientemente, se ha observado que un alto porcentaje de las células endocrinas del páncreas de individuos diabéticos presentan un patrón de envejecimiento prematuro<sup>27</sup>. Por otro lado, se ha visto que hay una asociación entre los cambios moleculares en el receptor de la vitamina D y la diabetes; de hecho, recientemente se ha publicado la disminución de la presencia del receptor de la vitamina D en pacientes diabéticos de tipo 2<sup>5</sup>. Además, se sabe que VDR puede intervenir en el patrón de diferenciación celular y que este se puede alterar durante un proceso de envejecimiento<sup>6</sup>. Por todo esto, el objetivo principal de este Trabajo de Fin de Grado es **estudiar el cambio en el perfil de expresión del islote pancreático con la edad**.

Este objetivo principal se dividió en los siguientes objetivos específicos:

1. Relacionar el envejecimiento del páncreas endocrino con la desdiferenciación celular de las células beta pancreáticas.
2. Estudiar el papel del receptor de la vitamina D en el mantenimiento de las células beta pancreáticas durante el envejecimiento.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Animales

Los ratones utilizados en este estudio pertenecen a colonias utilizadas en el Proyecto de estudio del papel del receptor de la vitamina D en procesos fisiológicos y pato-fisiológicos como la diabetes y el envejecimiento, los cuales han sido generados por la Unidad de Animales Transgénicos (UAT) y caracterizados en el Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica (CBATEG) de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB). Utilizamos ratones macho con un genotipo salvaje y unos otros ratones Transgénicos-VDR (Tg-VDR) que sobreexpresan el receptor de la vitamina D (VDR) específicamente en la célula beta. A su vez, de estos dos genotipos, se seleccionaron 4 grupos de diferentes edades: el grupo 1 (G1, jóvenes), comprendía ratones con menos de 6 meses de edad; el grupo 2 (G2, mediana edad), formado por ratones con más de 6 meses de edad y menos de 12 meses de edad; el grupo 3 (G3, viejos), constituido por ratones con más de 12 meses de edad y menos de 24 meses de edad; y el grupo 4 (G4, muy viejos), formado por ratones con más de 24 meses de edad.

Los ratones fueron estabulados en instalaciones libres de patógenos (SER-CBATEG), en condiciones de temperatura ambiental ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2$ ). Los animales fueron alimentados sin restringirles el acceso a la comida, con una dieta estándar (2018S Teklad Global, Harlan Teklad, Madison, Wisconsin, EE. UU.). A parte de la temperatura, también se controló las horas de luz estableciendo ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Para la eutanasia de los animales, se anestesiaron usando anestésicos inhalados (Isoflurano, IsoFlo®, Abbott Animal Health, Illinois, EE. UU.) y se decapitaron.

##### 3.1.1. Consideraciones Éticas

Dado que en este estudio se ven perjudicados seres vivos se debe tener en cuenta los aspectos éticos del procedimiento. Este Trabajo de Fin de Grado se halla dentro del marco del Proyecto de estudio del papel del receptor de la vitamina en procesos fisiológicos y pato-fisiológicos como la diabetes y el envejecimiento, por lo que los ratones utilizados en este estudio no han sido creados específicamente para este trabajo. Para la aprobación del uso de ratones en el proyecto se ha seguido un procedimiento en el que primero se presentó el proyecto con todos los procedimientos asociados, el cual fue revisado por el asesor en bienestar animal (ABA) de la instalación donde se realizó el estudio. Seguidamente, pasó a ser evaluado por todos los miembros del Comité de Ética en Experimentación Animal (CEEA). Posteriormente, el CEEA dio una valoración positiva al proyecto y se tramitó al Órgano Habilitado del Comité de Ética en Experimentación Animal de la Universidad Autónoma de Barcelona (OH-CEEA-UAB). Este es el enlace de la valoración positiva del proyecto [enlace](#).

#### 3.2. Diseño del estudio

Dentro del Proyecto de estudio del papel del receptor de la vitamina D en procesos fisiológicos y pato-fisiológicos como la diabetes y el envejecimiento, me ofrecieron diferentes propuestas:

- Análisis de la acción del receptor de la vitamina D (VDR) en el páncreas mediante el uso de un vector viral.
- Análisis de la acción del receptor de la vitamina D (VDR) en el cerebro mediante el uso de un vector viral.



- Análisis del papel del receptor de la vitamina D (VDR) en el envejecimiento del páncreas endocrino y su implicación en el proceso diabético.
- Análisis de los cambios moleculares mediados por el receptor de la vitamina D (VDR) durante el ayuno y durante un proceso diabético.

De las cuatro propuestas, elegí realizar el análisis del papel del receptor de la vitamina D (VDR) en el envejecimiento del páncreas endocrino y su implicación en el proceso diabético. Para tener una idea de cómo encaminar el proceso experimental realicé una búsqueda bibliográfica teniendo en cuenta diferentes conceptos: el páncreas endocrino; el desarrollo y formación del páncreas endocrino, junto con los factores que intervenían en el proceso; el envejecimiento y la desdiferenciación; y los mecanismos de acción de la vitamina D y su receptor (VDR). A partir de la información obtenida desarrollamos el proceso experimental que fue dividido en: la obtención de islotes pancreáticos, la extracción de RNA, la síntesis de cDNA, la cuantificación relativa de la expresión génica mediante qPCR y el análisis de los datos (figura 6).

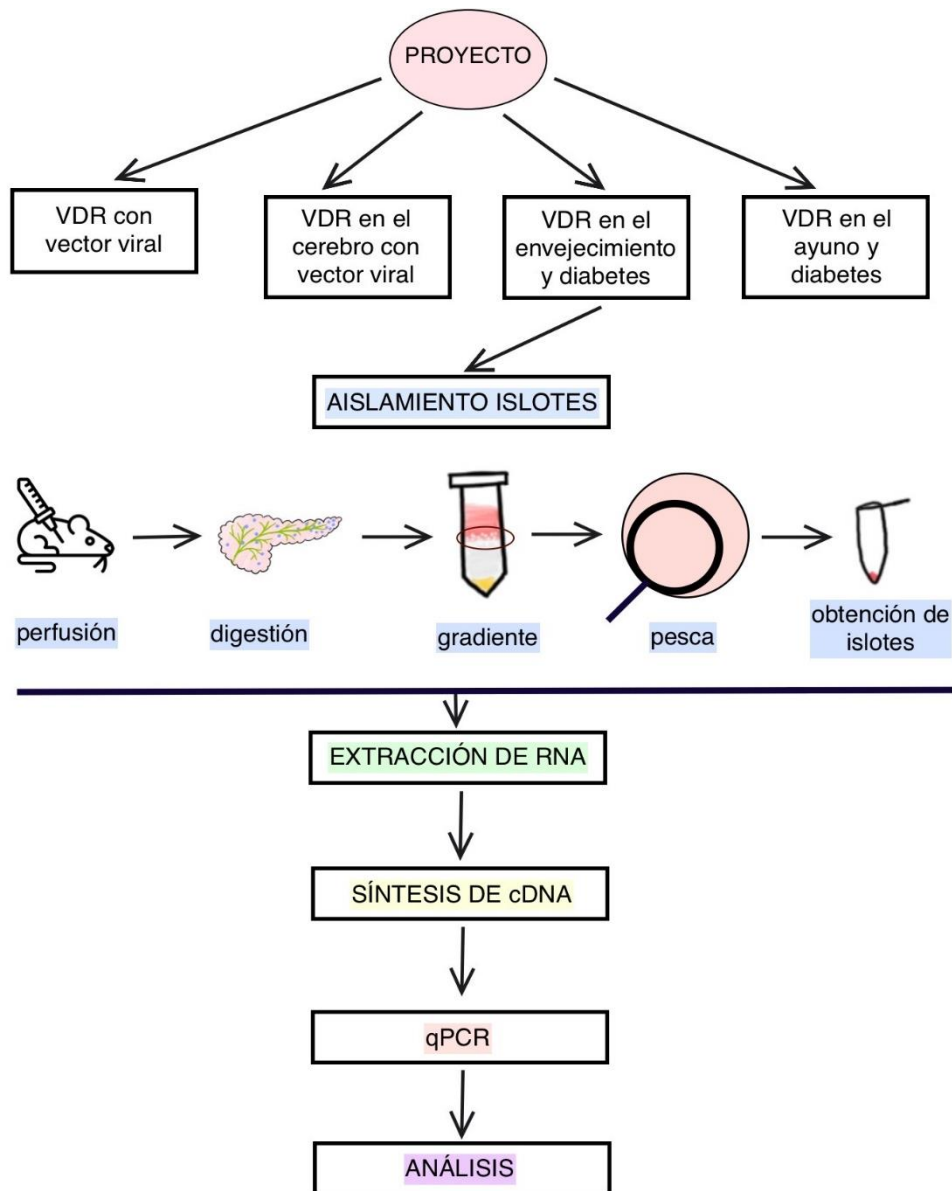


Figura 6. Esquema del diseño experimental. (Fuente propia)

### 3.3. Aislamiento de islotes pancreáticos

Los ratones fueron sacrificados y se perfundió el páncreas mediante la inyección de 3-5 mL de *Liberasa* (Roche; 0.104 mg/mL) diluida en medio sin sérum M199 (*Gibco-Life Technologies*, #10012-037). La inyección se realizó a través del conducto biliar común, pinzando la salida al intestino. El páncreas perfundido se recogió en un tubo de 50 mL y se mantuvo en hielo hasta haber completado el proceso en todos los ratones, teniendo en cuenta que entre el primer y el último ratón perfundido no puede pasar más de 1 hora. Recolectamos los páncreas perfundidos y se dejaron incubar a 37 °C durante 19 minutos para digerir el órgano. Añadimos 35 mL de medio M199 frío con un 10% de sérum (*Biowest*, #S0250-500) para frenar la reacción enzimática y agitamos 30 segundos. Posteriormente, realizamos dos lavados con medio M199 con sérum de 30 mL y 10 mL respectivamente, resuspendimos para terminar de disgregar el tejido y filtramos las muestras. Centrifugamos (*Eppendorf 5810R*, rotor A-4-62) los tubos a 200-230xG, durante 5 minutos a 4 °C. Seguidamente, el sobrenadante se descartó y se resuspendió el precipitado con 13 mL de *Histopaque-1077* (*Sigma*, 10771) frío y se completó con medio M199 sin sérum, evitando mezclar las dos fases, hasta un volumen de 25 mL. A continuación, se centrifugaron los tubos a 100xG durante 24 minutos a 4 °C sin aceleración ni deceleración, para que no se mezclen las fases y aislar los islotes en la interfase de las dos soluciones. La interfase se recolectó en un nuevo tubo usando una pipeta. Después, se realizaron tres centrifugas a 1400 rpm durante 3 minutos, combinadas con lavados de 40 mL de medio M199 con sérum. En el último lavado, se descarta el volumen hasta quedarnos con 15 mL y añadimos 200 µL de una solución de *Ditizona* (*Fluka*, #43820) (10 mL de volumen: 30 mg *Ditizona*, 9 mL EtOH, 150 µL NH<sub>4</sub>OH y 850 µL H<sub>2</sub>O) para teñir los islotes. Tras 5 minutos de incubación, los islotes se pasaron a una placa de Petri para poder ser pescados con una pipeta bajo la lupa. Los islotes eran recogidos en un tubo de 1,5 mL que se rellenaba con PBS hasta completarlo y se centrifugaron a 300xG, durante 5 minutos a 4 °C. Por último, el sobrenadante de los tubos se descartó y se conservó el precipitado que contenía los islotes.

### 3.4. Extracción de RNA

Los islotes aislados se digirieron con 1 mL de *TriPure Isolation Reagent* (Roche, 11667). La extracción de RNA se realizó usando el Kit comercial *RNeasy Micro Kit* (*QIAGEN*, *Invitrogen*, Cat.No.74104) cuyo protocolo se encuentra en el Anexo A. Se filtró el volumen de las muestras mediante el uso de columnas. Seguidamente, se realizaron una serie de lavados con diferentes alcoholes para fijar el RNA a la membrana. Finalmente, se eluyó la muestra con 14 µL de H<sub>2</sub>O.

Cuantificamos el RNA total usando la técnica de espectrofotometría. Determinamos la pureza y la concentración del RNA mediante la cuantificación de la absorbancia con *Synergy HTX Multimode Reader* (*BioTek*). Se midió la absorbancia a 230, 260 y 280 nm. La concentración de RNA se obtuvo cuantificando la absorbancia de 260 nm y a partir de la ratio de 260 y 280 nm, miramos la contaminación por DNA; y con la ratio de 260 y 230 nm, observamos la contaminación por compuestos orgánicos.

### 3.5. Síntesis de cDNA

El RNA total fue retrotranscrito a cDNA usando el kit comercial *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche, 04896866001). Partimos de una cantidad de 1 µg de RNA total y realizamos la síntesis de cDNA de dos pasos, siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo B). Para cada grupo de muestras preparamos una alícuota como control negativo de la RT-PCR. Finalmente, obtuvimos un volumen final de 20 µL de cDNA por muestra.

### 3.6. Cuantificación de la expresión

La cuantificación relativa del cDNA obtenido tras la RT-PCR se llevó a cabo mediante PCR cuantitativa (*qPCR*) usando *LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche, Cat. No. 04 887 352 001)* como método de detección. El cDNA de los diferentes genes a estudiar fue amplificado usando cebadores específicos (tabla 1) junto con los reactivos de la tabla 2. Seguidamente, se aplicó el programa específico para el *SYBR Green* y la fluorescencia emitida durante la reacción de PCR fue detectada con el instrumento *QuantStudio™ 5 System (Thermo Fisher Scientific)*. Finalmente, los datos obtenidos de la amplificación se analizaron con la *Thermo Fisher app*.

**Tabla 1. Cebadores utilizados en la qPCR para el análisis de la expresión de los islotes pancreáticos.**

Gen	Secuencia <i>Forward</i> (5' – 3')	Secuencia <i>Reverse</i> (5' – 3')
<b>mVDR</b>	GCATGCAAAAGGTCATCGGC	AGCGCAACATGATCACCTCA
<b>mINS.1</b>	AACTGGAGCTGGGAGGAAG	CACAATGCCACGCTTCTG
<b>mPDX1</b>	GAAATCCACCAAAGCTCACG	CGGGTCCGCTGTGTAAG
<b>mNGN3</b>	CGCAAGAAGGCCAATGATCG	CCAGATGTAGTTGTGGGCGA
<b>mFOXA2</b>	GAGCAGCAACATCACCACAG	CGTAGGCCTTGAGGTCCAT
<b>mNKX6.1</b>	CCCGGAGTGATGCAGAGT	GAACGTGGGTCTGGTGTGTT
<b>mGCK</b>	ATGACAGAGCCAGGATGGAG	CGGCTCATCACCTTCTTCAG
<b>mGLUT2</b>	CTGGAGCCCTCTTGATGGGA	CCAGTCCTGAAATTAGCCCACA
<b>mGCG</b>	ATCTTGCCACCAGGGACTTC	AAGTGACTGGCACGAGATGT
<b>mARX</b>	TTCCAGAAGACGCACTACC	TCTGTCAGGTCCAGCCTCAT
<b>h36B4</b>	TCCCACCTTGCTCCAGTCT	ACTGGTCTAGGACCCGAGAAG
<b>mRPLP0</b>	ACTGGTCTAGGACCCGAGAAG	TCCCACCTTGCTCCAGTCT
<b>mUBE2D2</b>	CGCGTCCCTTAGTCCACCT	GGATCTCGAGCCAGGTCATTC

Asumiendo que la qPCR ha tenido una tasa de amplificación del 100%, usamos el método matemático delta-delta-Ct ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ), descrito por Pfaffl<sup>28</sup>, para la cuantificación relativa de nuestros genes de interés. Se utilizaron 36B4, RPLP0 y ube2d2 como controles endógenos, los cuales se usaron para normalizar los genes de nuestro estudio. A los datos normalizados les aplicamos un cambio relativo (*fold change*) usando de referencia al grupo de ratones más jóvenes, tanto en los ratones controles como en los transgénicos.

**Tabla 2. Reactivos utilizados en la qPCR para el análisis de expresión.**

<b>Reacción SYBR Green</b>	<b>Volumen</b>
<i>SYBR Green LightCycler® 480 Probe Master</i>	5 µL
H2O Milli-Q	3,6 µL
<i>Primer forward (10 µM)</i>	0,2 µL
<i>Primer reverse (10 µM)</i>	0,2 µL
cDNA (dil. 1/5)	1 µL
<b>Volumen final</b>	<b>10 µL</b>

### 3.7. Análisis estadístico

Todos los valores se expresan como la media  $\pm$  error típico de la media (SEM). Las diferencias entre dos grupos se compararon mediante la prueba *T-Student*, y las diferencias entre tres o más grupos se analizaron mediante pruebas ANOVA de una vía o de dos vías utilizando el software *GraphPadPrism* (versión 7.00; software *GraphPad*). Las diferencias se consideraron significativas con un p-valor ajustado  $< 0.05 = *$  y  $< 0.01 = **$ , también indicamos los valores de p-valor.ajust menores a 0,1.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Obtención de islotes pancreáticos.

Dado que el objetivo es estudiar los cambios en la expresión durante el envejecimiento del páncreas endocrino, se realizó la perfusión del páncreas de 4 grupos diferentes de ratones, clasificados según la edad, durante diversos días tal y como se explica en el apartado de métodos. En la mayoría de los animales, el páncreas se perfundió satisfactoriamente. En la tabla 3 se recogen los resultados del número de islotes aislados y si hubo alguna observación de la perfusión. Todos los datos de la obtención de islotes se encuentran recogidos en el Anexo C.

*Tabla 3. Resultados recogidos de la obtención de islotes pancreáticos.*

Grupo	Nº animales	Edad	Genotipo	Nº islotes	Observaciones perfusión
G1	4	< 6 meses	Control	687	1 pinchado al final
G1	6	< 6 meses	Transgénico	1234	1 pinchado al final
G2	5	> 6 meses	Control	1117	1 pinchado al final
G2	7	> 6 meses	Transgénico	1685	
G3	7	> 12 meses	Control	1992	2 pinchados al final
G3	7	> 12 meses	Transgénico	1279	2 pinchados al final
G4	4	> 24 meses	Control	970	1 pinchado al final
G4	5	> 24 meses	Transgénico	1094	1 pinchado al final

El número de muestras (N) por grupo no era superior a 12 ya que el protocolo está diseñado para perfundir esa cantidad máxima de individuos en el tiempo que se establece. Es por eso, que la N en nuestro análisis de expresión es pequeña.

### 4.2. Extracción de RNA de islotes pancreáticos

Para poder estudiar la expresión génica en los diferentes grupos de edad, llevamos a cabo la extracción de RNA de los islotes pancreáticos aislados anteriormente. Antes de seguir procesando el RNA extraído, teníamos que analizar la calidad y la cantidad de muestra obtenida, mediante el uso de espectrofotometría.

A partir de la absorbancia, pudimos cuantificar la cantidad de RNA que dispone la muestra, ya que es necesario determinar este parámetro para saber si disponemos de suficiente RNA para hacer un correcto estudio de la expresión (tabla 4). Además, pudimos observar la integridad de nuestras muestras para descartar contaminación por parte de compuestos orgánicos usados en la extracción de RNA o contaminación con proteínas y DNA. Todos los datos de la extracción de RNA se encuentran recogidos en el Anexo C.

Tabla 4. Ejemplos de la calidad, integridad y concentración del RNA extraído.

Muestra	260	280	230	260/280	260/230	ng/ $\mu$ L
G1_7	5,451	2,791	3,408	1,953	1,6	272,53
G2_9	8,279	3,954	9,409	2,094	0,88	413,955
G3_4	31,638	15,685	15,999	2,017	1,978	1581,909
G4_4	1,309	0,701	12,564	1,866	0,104	65,428

### 4.3. Estudio del cambio en el perfil de expresión del islote pancreático con la edad

Con el objetivo de estudiar si el perfil génico de las células beta sufre cambios durante el envejecimiento del páncreas endocrino, analizamos la expresión de diferentes genes que pudiesen indicar una pérdida del perfil y a su vez, una desdiferenciación celular. Como modelo de envejecimiento usamos un grupo de ratones controles, para ver cómo se da esta pérdida del perfil génico de manera natural con el paso del tiempo.

Así pues, para estudiar el efecto del envejecimiento realizamos nuestro análisis a partir de tres grupos de ratones: el grupo 1 (G1), menores de 6 meses; el grupo 2 (G2), mayores de 6 meses y menores de 12 meses; y el grupo 3 (G3), mayores de 12 meses y menores de 24 meses.

#### 4.3.1. Análisis de la expresión de genes claves en el fenotipo de la célula beta pancreática

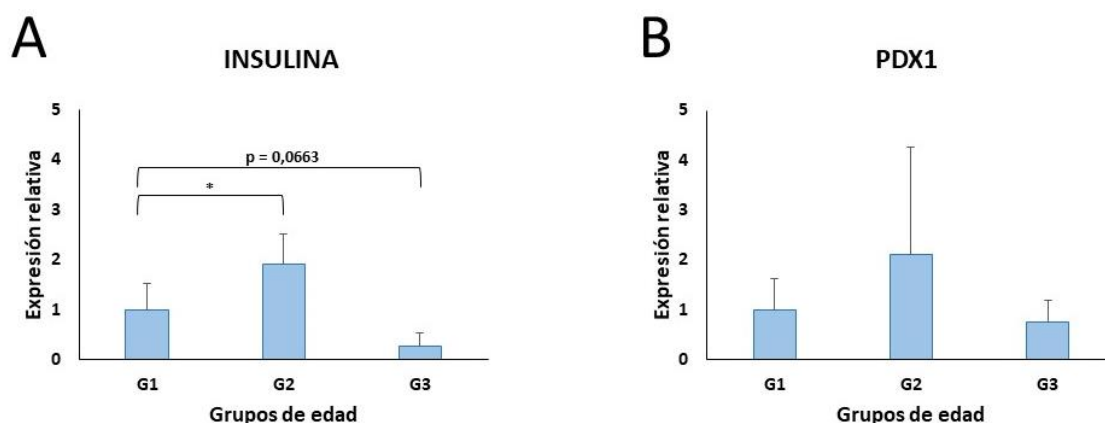


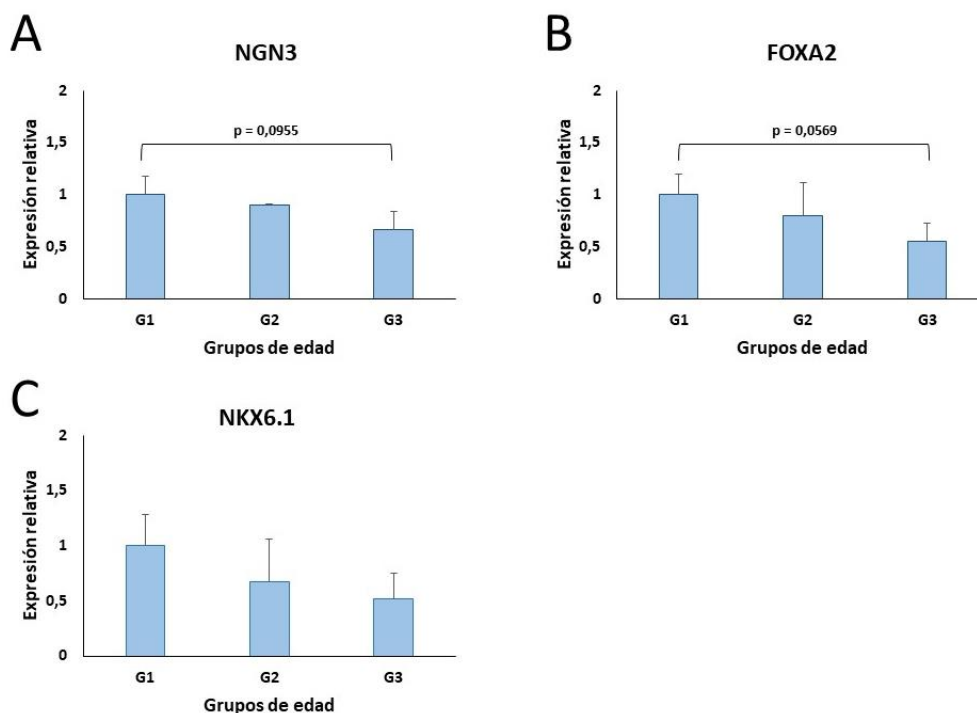
Figura 7. Análisis de la disminución de la expresión de genes claves en el fenotipo de la célula beta durante el envejecimiento en ratones controles. Se muestra la expresión de insulina y PDX1 en ratones menores de 6 meses (G1), mayores de 6 meses (G2) y mayores de 12 meses (G3). Se utilizaron como controles endógenos 36B4, RPLP0 y UBED2D para normalizar la expresión de los genes. Para la cuantificación relativa aplicamos el fold change usando de referencia al G1. Todos los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM y el análisis estadístico se realizó mediante pruebas de ANOVA tomando como referencia al G1. Las diferencias se consideraron significativas con un p-valor ajustado  $< 0.05 = *$  y  $< 0.01 = **$ , también indicamos los valores de p-valor ajustados menores a 0,1.

El fenotipo de la célula beta viene marcado principalmente por la expresión de insulina, PDX1 y MafA. Ambos tres son genes que están implicados en la síntesis de insulina, cuya producción es exclusiva de las células beta pancreáticas. Partiendo de esta base, analizamos la expresión de insulina y PDX1 en los ratones controles para observar si se producían cambios a lo largo de las distintas edades.

En la figura 7 se muestra el perfil de expresión de la insulina y de PDX1. Tanto la insulina como PDX1 presentaban una tendencia similar dado que PDX1 es un factor de transcripción que actúa sobre el gen de la insulina. A pesar de que observábamos, en ambos genes, un aumento de la expresión en los ratones del G2 (mediana edad), vimos una clara disminución en la expresión de estos genes en el G3, los ratones más viejos respecto a los ratones jóvenes (G1). Esta pérdida de expresión de insulina entre G3 y el G1 era de hasta un 75% (figura 7A), en cambio la pérdida de PDX1 era mucho menor (figura 7B).

#### 4.3.2. Análisis de la expresión de genes precursores del fenotipo de la célula beta

Las células beta pancreáticas derivan de células progenitoras de páncreas y dependiendo de la expresión génica que tenga esta célula progenitora se diferenciará en un tipo celular u otro. Para examinar si había cambios en el nivel de diferenciación de las células progenitoras de célula beta analizamos la expresión de genes precursores del fenotipo de la célula beta. Por ello, realizamos el análisis de la expresión de NGN3, NKX6.1 y FOXA2.

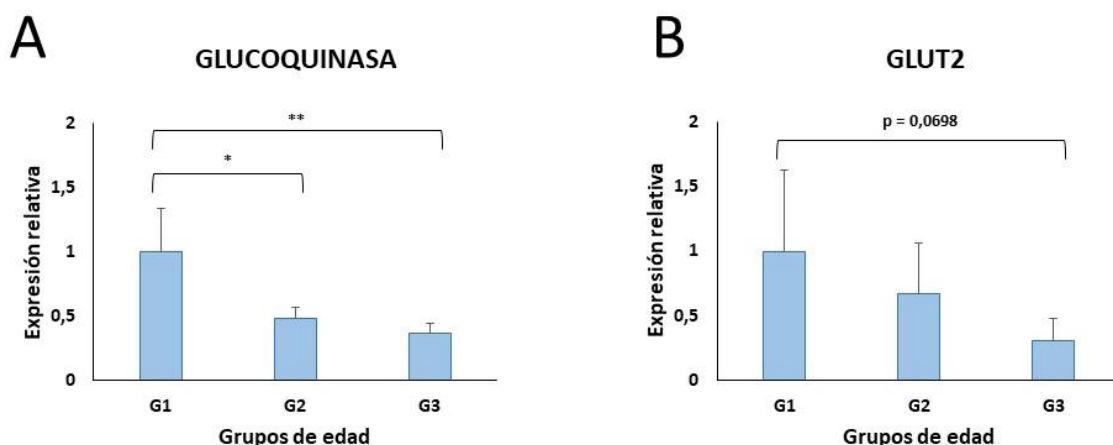


**Figura 8. Análisis de la pérdida de expresión de genes precursores del fenotipo de la célula beta durante el envejecimiento en ratones controles.** Se muestra la expresión de NGN3, FOXA2 y NKX6.1 en ratones menores de 6 meses (G1), mayores de 6 meses (G2) y mayores de 12 meses (G3). Se utilizaron como controles endógenos 36B4, RPLP0 y UBED2D para normalizar la expresión de los genes. Para la cuantificación relativa aplicamos el fold change usando de referencia al G1. Todos los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM y el análisis estadístico se realizó mediante pruebas de ANOVA tomando como referencia al G1. Las diferencias se consideraron significativas con un p-valor ajustado  $< 0.05 = *$  y  $< 0.01 = **$ , también indicamos los valores de p-valor.ajust menores a 0,1.

En la figura 8, se muestra una pérdida en la expresión de NGN3 y FOXA2, concretamente a la hora de comparar el G1 y G3, a pesar de que no se reflejaban diferencias significativas. A lo que respecta a la expresión del factor NKX6.1, no observábamos diferencias significativas, pero si una tendencia a la pérdida paulatina de la expresión de NKX6.1 (figura 8C). En consecuencia, distinguimos una pérdida de la expresión de estos marcadores a lo largo de la edad.

#### 4.3.3. Análisis de la expresión de genes que forman la maquinaria celular implicada en la funcionalidad de la célula

El envejecimiento celular no solo se traduce en una pérdida del fenotipo, sino también en una pérdida de la funcionalidad. Para poder estudiar la pérdida de la funcionalidad analizamos enzimas y transportadores, que forman parte de la maquinaria celular, específica de las células beta. Realizamos el estudio de la expresión de la glucoquinasa y GLUT2, enzima y transportador que intervienen en el metabolismo de la glucosa, los cuales son indicadores del estado de la funcionalidad de la célula beta.



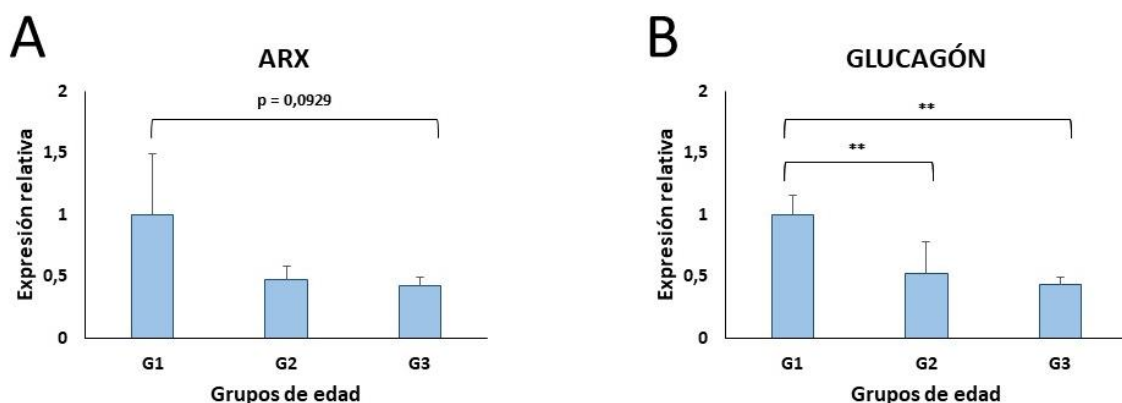
**Figura 9. Análisis de la disminución en la expresión de genes implicados en la funcionalidad de la célula beta durante el envejecimiento en ratones controles.** Se muestra la expresión de glucoquinasa y GLUT2 en ratones menores de 6 meses (G1), mayores de 6 meses (G2) y mayores de 12 meses (G3). Se utilizaron como controles endógenos 36B4, RPLP0 y UBED2D para normalizar la expresión de los genes. Para la cuantificación relativa aplicamos el fold change usando de referencia al G1. Todos los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM y el análisis estadístico se realizó mediante pruebas de ANOVA tomando como referencia al G1. Las diferencias se consideraron significativas con un p-valor ajustado  $< 0.05 = *$  y  $< 0.01 = **$ , también indicamos los valores de p-valor.ajust menores a 0,1.

Los resultados mostraron que durante el envejecimiento había un descenso en la expresión de glucoquinasa y GLUT2 (figura 9), por lo que sí que determinamos una pérdida de la funcionalidad de la maquinaria celular.

#### 4.3.4. Análisis de la expresión de genes implicados en el mantenimiento de la identidad de la célula alfa

Para tener una idea del estado general del islote pancreático y como afecta el envejecimiento al páncreas endocrino estudiamos el segundo tipo celular más abundante del islote, la célula alfa. Con el objetivo de observar si las células alfa también sufren una pérdida de marcadores propios de su fenotipo, estudiamos la expresión de glucagón y ARX, ambos factores específicos de este tipo celular.





**Figura 10. Análisis de la pérdida en la expresión de genes implicados en el mantenimiento de la identidad de la célula alfa durante el envejecimiento en ratones controles.** Se muestra la expresión de ARX y glucagón en ratones menores de 6 meses (G1), mayores de 6 meses (G2) y mayores de 12 meses (G3). Se utilizaron como controles endógenos 36B4, RPLP0 y UBED2D para normalizar la expresión de los genes. Para la cuantificación relativa aplicamos el fold change usando de referencia al G1. Todos los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM y el análisis estadístico se realizó mediante pruebas de ANOVA tomando como referencia al G1. Las diferencias se consideraron significativas con un p-valor ajustado  $< 0.05 = *$  y  $< 0.01 = **$ , también indicamos los valores de p-valor.ajust menores a 0,1.

El resultado de este análisis mostraba que había también una disminución de hasta un 50 % en la expresión de glucagón y ARX con el envejecimiento del páncreas (figura 10). Se observó el mismo patrón de pérdida en ambos genes y, por lo tanto, una pérdida de la identidad de las células alfa.

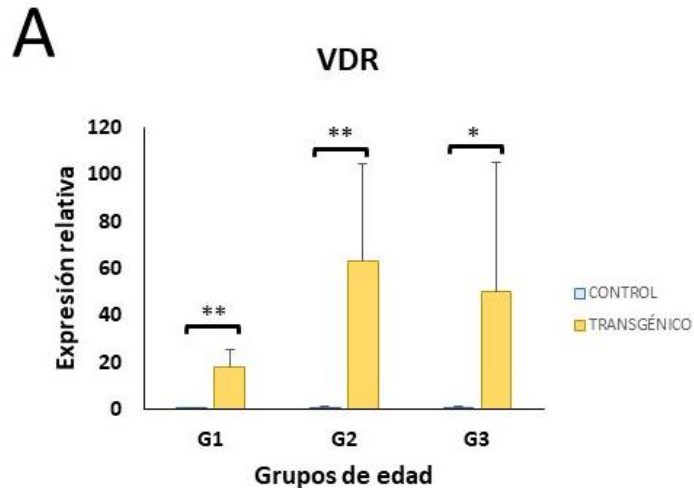
A lo que refiere al estudio del perfil de expresión durante el envejecimiento, los datos de esta parte del estudio sugieren que el islote pancreático pierde su identidad y se desdiferencia con el envejecimiento, en concreto, la célula beta cuyo papel es importante en la coordinación de la glucosa en sangre.

#### 4.4. Estudio del efecto de VDR en el mantenimiento del islote pancreático

Como se ha mencionado en la introducción, la literatura sugiere que VDR tiene un efecto protector frente a la diabetes en condiciones de hiperglucemia y que mutaciones en este receptor están asociadas a la diabetes de tipo 2 en diversas poblaciones. Es por ello, que estudiamos el efecto de VDR en el envejecimiento, factor que está íntimamente relacionado con esta enfermedad.

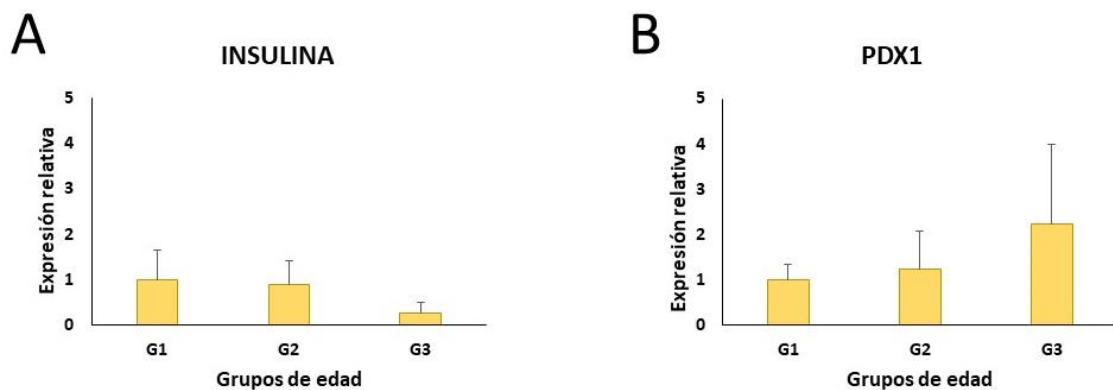
Dado que los resultados anteriores mostraban que el perfil de expresión del islote presentaba una disminución clara de genes importantes en el envejecimiento, en este trabajo se planteó determinar si la vitamina D, a través de su receptor VDR, podría retrasar o evitar estos cambios.

Para ello se estudiaron islotes pancreáticos procedentes de animales transgénicos que sobreexpresan el gen de VDR específicamente en la célula beta (figura 11). En este, realizamos el mismo análisis de expresión que con los ratones controles, con los mismos grupos de edad y examinando los mismos genes.



**Figura 11. Análisis de la sobreexpresión de VDR en ratones transgénicos.** Se muestra la expresión de VDR en ratones controles y transgénicos menores de 6 meses (G1), mayores de 6 meses (G2) y mayores de 12 meses (G3). Se utilizaron como controles endógenos 36B4, RPLP0 y UBED2D para normalizar la expresión de los genes. Para la cuantificación relativa aplicamos el fold change usando de referencia a los controles de cada grupo de edad. Todos los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM y el análisis estadístico se realizó mediante la prueba T-Student en cada grupo de edad, tomando como referencia a los ratones controles. Las diferencias se consideraron significativas con un  $p$ -valor ajustado  $< 0.05 = *$  y  $< 0.01 = **$ , también indicamos los valores de  $p$ -valor.ajust menores a 0,1.

#### 4.4.1. Análisis de la expresión de genes involucrados en el fenotipo de la célula beta pancreática en ratones transgénicos



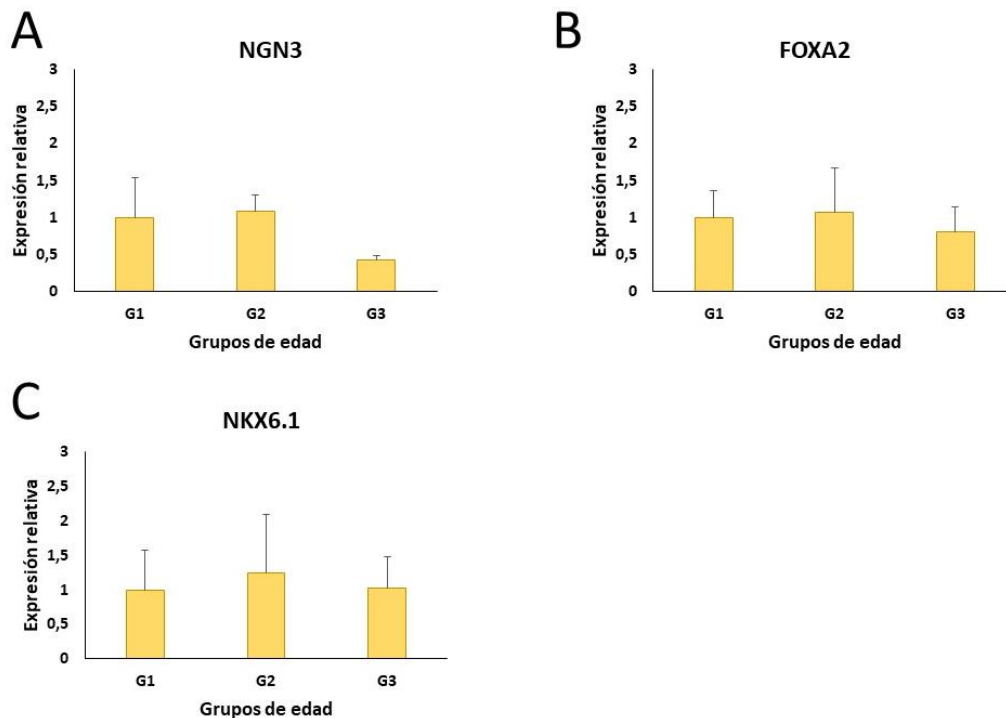
**Figura 12. Análisis del cambio en la expresión de genes claves en el fenotipo de la célula beta durante el envejecimiento en ratones transgénicos.** Se muestra la expresión de insulina y PDX1 en ratones menores de 6 meses (G1), mayores de 6 meses (G2) y mayores de 12 meses (G3). Se utilizaron como controles endógenos 36B4, RPLP0 y UBED2D para normalizar la expresión de los genes. Para la cuantificación relativa aplicamos el fold change usando de referencia al G1. Todos los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM y el análisis estadístico se realizó mediante pruebas de ANOVA tomando como referencia al G1. Las diferencias se consideraron significativas con un  $p$ -valor ajustado  $< 0.05 = *$  y  $< 0.01 = **$ , también indicamos los valores de  $p$ -valor.ajust menores a 0,1.

Para estudiar el cambio del fenotipo de la célula beta en los animales transgénicos analizamos la expresión de insulina y PDX1 (figura 12). El primer análisis de los resultados mostraba que la expresión de insulina y PDX1 seguía un patrón distinto en los animales transgénicos, lo contrario a lo que presentaban los ratones controles donde ambos genes seguían el mismo patrón (figura 12). La expresión de insulina y PDX1 en los dos primeros grupos de edades se mantenía y era posteriormente, en el último grupo, cuando se observaba una disminución del 75% en la expresión de insulina y un aumento del 100% de PDX1 (figura 12A y

12B). Estos resultados sugieren que el hecho de tener sobreexpresado VDR afectaba al patrón de expresión de marcadores de célula beta durante el envejecimiento.

#### 4.4.2. Análisis de la expresión de genes precursores del fenotipo de la célula beta en ratones transgénicos

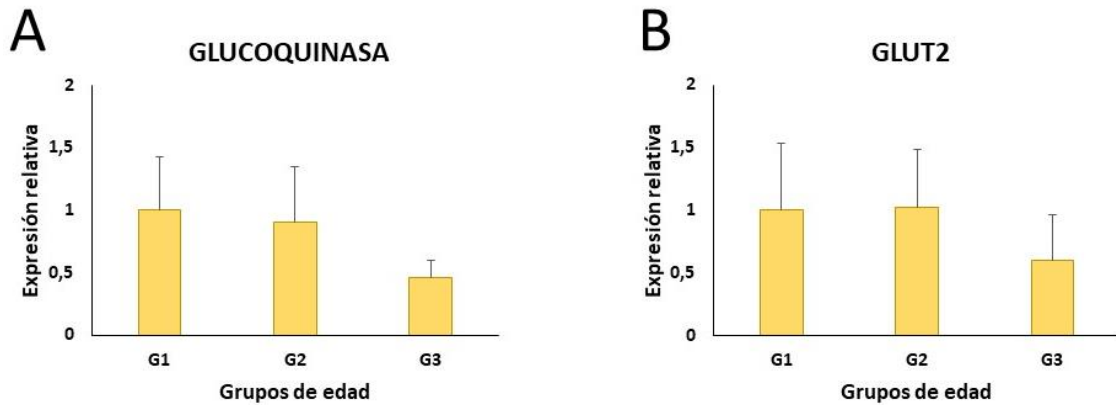
En cuanto al análisis de la expresión de precursores del fenotipo de la célula beta por parte de las células progenitoras en los animales transgénicos, obtuvimos los datos que se muestran en la figura 13. Tanto la expresión de NGN3 y FOXA2 en los dos primeros grupos se mantenía y era posteriormente, cuando se observaba una pérdida en la expresión de estos dos genes en el tercer grupo. Por otro parte, en la expresión de NKX6.1 no se mostraba ninguna pérdida de la expresión a lo largo de los diferentes grupos; de hecho, observamos un aumento en el grupo 2 (figura 13C).



**Figura 13. Análisis de la de expresión de genes precursores del fenotipo de la célula beta durante el envejecimiento en ratones transgénicos.** Se muestra la expresión de NGN3, FOXA2 y NKX6.1 en ratones menores de 6 meses (G1), mayores de 6 meses (G2) y mayores de 12 meses (G3). Se utilizaron como controles endógenos 36B4, RPLP0 y UBED2D para normalizar la expresión de los genes. Para la cuantificación relativa aplicamos el fold change usando de referencia al G1. Todos los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM y el análisis estadístico se realizó mediante pruebas de ANOVA tomando como referencia al G1. Las diferencias se consideraron significativas con un p-valor ajustado  $< 0.05 = *$  y  $< 0.01 = **$ , también indicamos los valores de p-valor.ajust menores a 0,1.

#### 4.4.3. Análisis de la expresión de la maquinaria celular implicada en la funcionalidad de la célula beta en ratones transgénicos.

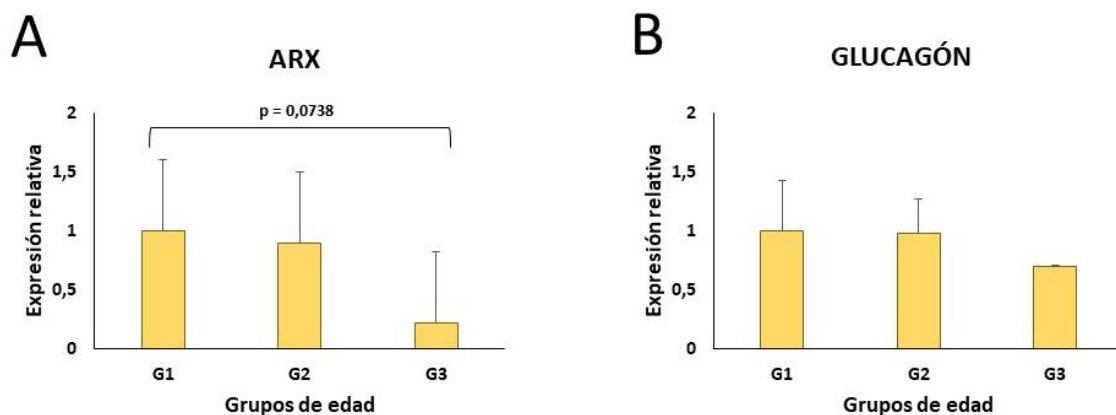
Con el objetivo de determinar si la sobreexpresión de VDR también ayuda a mantener la funcionalidad de la célula beta, estudiamos el estado de parte de la maquinaria celular con el análisis de la expresión de glucoquinasa y GLUT2.



**Figura 14. Análisis de la disminución en la expresión de genes implicados en la funcionalidad de la célula beta durante el envejecimiento en ratones transgénicos.** Se muestra la expresión de glucoquinasa y GLUT2 en ratones menores de 6 meses (G1), mayores de 6 meses (G2) y mayores de 12 meses (G3). Se utilizaron como controles endógenos 36B4, RPLP0 y UBED2D para normalizar la expresión de los genes. Para la cuantificación relativa aplicamos el fold change usando de referencia al G1. Todos los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM y el análisis estadístico se realizó mediante pruebas de ANOVA tomando como referencia al G1. Las diferencias se consideraron significativas con un p-valor ajustado  $< 0.05 = *$  y  $< 0.01 = **$ , también indicamos los valores de p-valor.ajust menores a 0,1.

En la figura 14, podemos ver que en los dos primeros grupos la expresión se mantenía similar y no era hasta la edad más avanzada (G3) cuando la expresión de glucoquinasa y GLUT2 disminuía. Estos datos sugieren que el hecho de tener VDR en las células beta puede retardar la pérdida de expresión de glucoquinasa y GLUT2, por lo tanto, un retraso en la pérdida de la funcionalidad.

#### 4.4.4. Análisis de la expresión de genes implicados en el mantenimiento de la identidad de la célula alfa.



**Figura 15. Análisis de la pérdida en la expresión de genes implicados en el mantenimiento de la identidad de la célula alfa durante el envejecimiento en ratones transgénicos.** Se muestra la expresión de ARX y glucagón en ratones menores de 6 meses (G1), mayores de 6 meses (G2) y mayores de 12 meses (G3). Se utilizaron como controles endógenos 36B4, RPLP0 y UBED2D para normalizar la expresión de los genes. Para la cuantificación relativa aplicamos el fold change usando de referencia al G1. Todos los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM y el análisis estadístico se realizó mediante pruebas de ANOVA tomando como referencia al G1. Las diferencias se consideraron significativas con un p-valor ajustado  $< 0.05 = *$  y  $< 0.01 = **$ , también indicamos los valores de p-valor.ajust menores a 0,1.

Todos estos resultados nos sugieren que el hecho de tener VDR, mediador de la acción de la vitamina D, retrasa el envejecimiento del islote, manteniendo las células beta más sanas y funcionales.

Con el fin de determinar si el hecho de tener VDR en las células beta también afectaba al patrón de expresión de genes marcadores de célula alfa, se analizó la expresión de marcadores de célula alfa en los animales transgénicos (figura 15). Se observó que los niveles en la expresión de ARX se mantenían en los dos primeros grupos y luego se observaba un descenso del 75% en el grupo de ratones más viejos, patrón similar al de los genes de célula beta. A lo que respecta a la expresión de glucagón, el G1 y G2 reflejaban una expresión similar y en el G3 se produjo un descenso del 25 %.

## 5. DISCUSIÓN

La diabetes de tipo 2 (T2D) es una enfermedad de impacto epidemiológico, en la que el organismo no es capaz de dirigir la glucosa en sangre hacia los distintos tejidos. Esto se debe a una mala funcionalidad de las células beta pancreáticas a la hora de secretar insulina, lo que causa condiciones de hiperglucemia. Esta enfermedad es causada por varios factores como la obesidad, el estilo de vida sedentario y el envejecimiento. El envejecimiento es el principal factor de riesgo para la mayoría de las enfermedades crónicas, incluida la T2D<sup>26</sup>. Con la edad se ve una pérdida del fenotipo y funcionalidad de las células en la mayoría de los tejidos, hecho que se ha asociado con la desdiferenciación celular<sup>1</sup>. Estudios sugieren una de las causas de la T2D es el mecanismo de desdiferenciación el que origina la pérdida de la funcionalidad en las células beta pancreáticas<sup>2-4,27,29,30</sup>. Por otro lado, se ha descrito que la vitamina D, junto con su receptor, tiene un efecto protector en la desdiferenciación de las células beta en estados de hiperglucemia, por lo que se cree que VDR podría actuar manteniendo un estado sano de las células beta, impidiendo la desdiferenciación y frenando así la aparición de la T2D<sup>6</sup>. Es por ello, que hemos realizado este estudio con el objetivo de analizar la pérdida del perfil de expresión del islote pancreático, en concreto de las células beta, durante el envejecimiento y ver el papel de VDR en el islote con la edad.

A lo que refiere al estudio del perfil de expresión con la edad, se realizó el análisis a partir de los datos de expresión de ratones controles para determinar si había cambios en la expresión de manera natural durante el envejecimiento. Primero, analizamos la expresión de insulina y PDX1, ambos marcadores propios de la célula beta, observando que los dos seguían el mismo patrón de expresión debido a que PDX1 es un factor que inicia la transcripción de la insulina<sup>17,19</sup>. Los datos reflejaron un descenso en la expresión de estos marcadores del fenotipo de la célula beta, en los islotes de los animales viejos, lo que significaría la pérdida de su fenotipo, ya que la principal característica de la célula beta es la producción de insulina. Luego, analizamos la expresión de precursores del fenotipo de la célula beta y en los tres factores de transcripción (NGN3, FOXA2 y NKX6) se produjo un descenso en la expresión con la edad. Se ha descrito que estos tres precursores son necesarios tanto para la formación del páncreas endocrino como para la diferenciación de las células endocrinas progenitoras a células beta y su mantenimiento, por lo que la pérdida de esta expresión podría ocasionar la pérdida del fenotipo<sup>16,18,19</sup>. Posteriormente, continuamos con el estudio de la funcionalidad de la célula beta analizando la expresión de glucoquinasa y GLUT2, proteínas claves en estos procesos, en el que se nos mostró una pérdida de la expresión de ambos genes, que se traduce en una pérdida de la funcionalidad celular<sup>31,32</sup>. Por último, para tener una visión general del estado del islote pancreático realizamos el análisis de marcadores del fenotipo de las células alfa (ARX y glucagón) donde pudimos determinar que durante el envejecimiento las células alfa también sufren una pérdida de la expresión y a su vez, una desdiferenciación celular<sup>19,21,22</sup>.

Los resultados de esta parte del estudio sugieren que con la edad hay una clara pérdida de la expresión de genes claves para la funcionalidad del islote pancreático que puede traducirse en una desdiferenciación de la célula, similar a lo que está descrito en la diabetes de tipo 2<sup>2-4,23,27,29,30,33</sup>.

A raíz de la premisa de que se ha descrito que la vitamina D, junto a su receptor VDR, tiene un efecto protector del páncreas endocrino frente a la diabetes, realizamos un estudio del papel de VDR en el mantenimiento del páncreas endocrino durante el envejecimiento en ratones transgénicos-VDR<sup>4,5</sup>. Primero, analizamos marcadores propios de la identidad de la célula beta, pudimos ver que la insulina se mantiene estable en las dos primeras edades y es en el G3 donde disminuye la expresión. En cambio, la expresión de PDX1 aumenta con la edad dejando ver que

en los ratones transgénicos la expresión de PDX1 e insulina no siguen el mismo patrón, al contrario de lo que sucedía en los ratones controles. El factor de transcripción PDX1 es el que inicia la transcripción de la insulina por lo que lo esperado sería ver que presenten el mismo patrón de expresión y que esto no sea así en los ratones transgénicos, nos sugiere que el aumento de PDX1 puede que tenga como objetivo compensar la pérdida de la expresión de insulina. Seguidamente, en el análisis de la expresión de los precursores de la identidad de célula beta, NGN3 se expresa similar en el G1 y G2, y es en el G3 que sufre una disminución de la expresión. Los factores de transcripción FOXA2 y NKX6.1 se expresan de manera similar a lo largo de los tres grupos de edad, al contrario de lo observado en el estudio con islotes controles. Esto es un hecho importante ya que ambos dos se encargan de mantener el fenotipo y la funcionalidad de la célula beta<sup>18-20</sup>. Posteriormente, analizamos la funcionalidad de la célula beta donde observamos que en los dos primeros grupos la expresión de glucoquinasa y GLUT2 se mantenía parecida y era después, en el G3, donde disminuía la expresión. A diferencia de los ratones controles que mostraban un descenso en la expresión a medida que envejecían, los ratones transgénicos mostraban una disminución solo en los ratones más viejos. Finalmente, para obtener información del estado general del islote también en los ratones transgénicos analizamos la expresión de marcadores de identidad de célula alfa. Similarmente que, con los marcadores beta, la expresión de glucagón y ARX es parecida en los dos primeros grupos y posteriormente, desciende la expresión en el G3. Sin embargo, en los islotes controles esta disminución aparecía mucho antes.

Estos resultados nos sugieren que el hecho de sobreexpresar VDR en las células beta contribuye a un retraso en la pérdida del fenotipo de las células beta y las células alfa durante el envejecimiento, manteniendo así la funcionalidad del islote. Esto podría traducirse en que es posible que VDR tenga un papel protector frente a la desdiferenciación celular y explicar el por qué se ha visto en otros estudios que VDR tiene un efecto protector frente a la diabetes T2D<sup>5,6</sup>.

Por último, dado que parecía que el hecho de tener VDR protegía al islote de envejecer, realizamos un estudio comparativo del efecto de VDR en animales mucho más viejos que los utilizados anteriormente. Al principio del estudio, se iban a usar 14 ratones de 28 meses de edad, que incluía tanto ratones transgénicos como ratones controles, pero la mitad de los animales fallecieron. La vida media de un ratón no suele superar los 22 meses, de manera, que, en este caso, sin querer, habíamos sesgado nuestro grupo muestral, ya que nosotros nos quedamos con los supervivientes. Al haberlos sesgado, los resultados no reflejaban la realidad y es por esta razón, que los resultados obtenidos no se incluyeron en este trabajo.

## 6. CONCLUSIÓN

- 1) El perfil de expresión del islote pancreático cambia durante el envejecimiento.
- 2) La expresión de genes claves en el fenotipo de la célula beta pancreática se ve reducida con la edad.
- 3) Hay una pérdida de la expresión de genes precursores del fenotipo de la célula beta con el envejecimiento.
- 4) La funcionalidad de la célula se ve afectada ya que, disminuye la expresión de la maquinaria celular con la edad.
- 5) Las células alfa también sufren una pérdida de la expresión génica y de su identidad durante el envejecimiento.
- 6) La pérdida del perfil de expresión puede desembocar en la desdiferenciación de las células beta pancreáticas, contribuyendo en el desarrollo la diabetes de tipo 2.
- 7) La sobreexpresión de VDR retrasa la pérdida del fenotipo de la célula beta.
- 8) La sobreexpresión de VDR demora la pérdida de precursores y mantenedores del fenotipo de célula beta.
- 9) La sobreexpresión de VDR retrasa la pérdida de la funcionalidad de la célula beta.
- 10) La sobreexpresión de VDR retarda la pérdida de la identidad de célula alfa.
- 11) El hecho de sobreexpresar VDR retrasa la pérdida del perfil génico del islote pancreático durante el envejecimiento, retrasando la desdiferenciación de este, siendo posible que tenga un efecto protector frente a la diabetes de tipo 2.

### 6.1. Limitaciones y mejoras para realizar en proyectos futuros

La principal limitación de este estudio son las muestras. Desde la perfusión ya se nos limita el número de ratones que podemos perfundir y la perfusión es una técnica complicada de la que dependen muchos factores: el conducto biliar de los ratones, si entra aire en el conducto, si el conducto está taponado, la persona que perfunde, etc. Después, en muchas ocasiones es posible que la digestión del páncreas no se haya dado correctamente y después, el número de islotes sea muy reducido. Aunque el protocolo de obtención de islotes se haya dado correctamente, partimos de muy poco tejido del que obtener nuestro RNA y luego, a la hora de cuantificar la expresión es más difícil obtener buenos resultados.



El estudio de ratones más viejos fue descartado ya que sesgamos al grupo de ratones. Lo ideal sería realizar el análisis en ratones mayores a 20 meses, pero menores a 24 meses, de esta manera puede que no sesguemos a los ratones.

Una mejora de este trabajo sería realizar el estudio en ratones hembra para poder tener datos sobre las afectaciones fisiológicas de este estudio en las mujeres.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Palmer, A. K., Gustafson, B., Kirkland, J. L. & Smith, U. Cellular senescence: at the nexus between ageing and diabetes. *Diabetologia* vol. 62 (2019).
2. Dor, Y. & Glaser, B. Beta-Cell Dedifferentiation and Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine* **368**, (2013).
3. Hunter, C. S. & Stein, R. W. Evidence for loss in identity, de-differentiation, and trans-differentiation of islet  $\beta$ -cells in type 2 diabetes. *Frontiers in Genetics* vol. 8 (2017).
4. Neelankal John, A., Ram, R. & Jiang, F. X. RNA-Seq Analysis of Islets to Characterise the Dedifferentiation in Type 2 Diabetes Model Mice db/db. *Endocrine Pathology* **29**, (2018).
5. Morró, M. *et al.* Vitamin D receptor overexpression in  $\beta$ -cells ameliorates diabetes in mice. *Diabetes* **69**, (2020).
6. Neelankal John, A. *et al.* Vitamin D receptor-targeted treatment to prevent pathological dedifferentiation of pancreatic  $\beta$  cells under hyperglycaemic stress. *Diabetes and Metabolism* **44**, (2018).
7. Rodríguez G., J. *et al.* Desarrollo de los Islotes de Langerhans en Páncreas de Alpacas Neonatas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* **26**, 381 (2015).
8. H. Hesham A-Kader . Fayez K. Ghishan. The pancreas. in *Textbook of Clinical Pediatrics* (2012). doi:10.1007/978-3-642-02202-9.
9. Dolenšek, J., Rupnik, M. S. & Stožer, A. Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas. *Islets* vol. 7 (2015).
10. Pallagi, P., Hegyi, P. & Rakonczay, Z. The physiology and pathophysiology of pancreatic ductal secretion the background for clinicians. *Pancreas* vol. 44 (2015).
11. Quesada, I., Tudurí, E., Ripoll, C. & Nadal, Á. Physiology of the pancreatic  $\alpha$ -cell and glucagon secretion: Role in glucose homeostasis and diabetes. *Journal of Endocrinology* vol. 199 (2008).
12. Sastre, J., Sabater, L. & Aparisi, L. Physiology of pancreatic secretion. *Gastroenterologia y Hepatologia* **28**, (2005).
13. Teichenné Jané, J. Estudi de la reprogramació de cèl·lules acinars a cèl·lules beta mitjançant factors de transcripció. *TDX (Tesis Doctorals en Xarxa)* (2015).
14. Dhawan, S., Georgia, S. & Bhushan, A. Formation and regeneration of the endocrine pancreas. *Current Opinion in Cell Biology* vol. 19 (2007).

15. Andrei, S. R. & Gannon, M. Embryonic development of the endocrine pancreas. in *Transplantation, Bioengineering, and Regeneration of the Endocrine Pancreas: Volume 2* (2019). doi:10.1016/B978-0-12-814831-0.00012-9.
16. Honzawa, N. & Fujimoto, K. The plasticity of pancreatic  $\beta$ -cells. *Metabolites* vol. 11 (2021).
17. Gao, T. *et al.* Pdx1 maintains  $\beta$  cell identity and function by repressing an  $\alpha$  cell program. *Cell Metabolism* **19**, (2014).
18. Schaffer, A. E. *et al.* Nkx6.1 Controls a Gene Regulatory Network Required for Establishing and Maintaining Pancreatic Beta Cell Identity. *PLoS Genetics* **9**, (2013).
19. van der Meulen, T. & Huisin, M. O. Role of transcription factors in the transdifferentiation of pancreatic islet cells. *Journal of Molecular Endocrinology* vol. 54 (2015).
20. Lee, C. S., Sund, N. J., Behr, R., Herrera, P. L. & Kaestner, K. H. Foxa2 is required for the differentiation of pancreatic  $\alpha$ -cells. *Developmental Biology* **278**, (2005).
21. Gage, B. K. *et al.* The role of ARX in human pancreatic endocrine specification. *PLoS ONE* **10**, (2015).
22. Friedman-Mazursky, O., Elkon, R. & Efrat, S. Redifferentiation of expanded human islet  $\beta$  cells by inhibition of ARX. *Scientific Reports* **6**, (2016).
23. Téllez, N., Vilaseca, M., Martí, Y., Pla, A. & Montanya, E.  $\beta$ -cell dedifferentiation, reduced duct cell plasticity, and impaired  $\beta$ -cell mass regeneration in middle-aged rats. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **311**, (2016).
24. Ximelis Bujosa, A. Generació d'un vector viral per a sobreexpressar VDR en les cèl·lules  $\beta$  pancreàtiques. (2021).
25. de Oliveira, V., Muller Lara, G., Dutra Lourenço, E., Daniele Boff, B. & Zirbes Stauder, G. Influencia de la vitamina D en la salud humana. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* **48**, (2014).
26. Guzman Velazco, J. B. & Ramos Brena, M. V. Diabetes Mellitus Tipo 2: Epidemiología y Emergencia en Salud. *Salud y Administracion* **1**, (2014).
27. Weir, G. C., Aguayo-Mazzucato, C. & Bonner-Weir, S. B-cell dedifferentiation in diabetes is important, but what is it. *Islets* vol. 5 (2013).
28. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29**, (2001).
29. Talchai, C., Xuan, S., Lin, H. v., Sussel, L. & Accili, D. Pancreatic  $\beta$  cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic  $\beta$  cell failure. *Cell* **150**, (2012).

30. Efrat, S. Beta-Cell Dedifferentiation in Type 2 Diabetes: Concise Review. *Stem Cells* **37**, (2019).
31. Stolarczyk, E. *et al.* Loss of sugar detection by GLUT2 affects glucose homeostasis in mice. *PLoS ONE* **2**, (2007).
32. Lu, G. *et al.* Overexpression of a glucokinase point mutant in the treatment of diabetes mellitus. *Gene Therapy* **23**, (2016).
33. Amo-Shiinoki, K. *et al.* Islet cell dedifferentiation is a pathologic mechanism of long-standing progression of type 2 diabetes. *JCI Insight* **6**, (2021).

## ANEXO A

### RNeasy Micro Kit - QIAGEN

#### Protocol: Purification of Total RNA from Animal and Human Tissues

1. Add 1 volume (usually 350  $\mu$ l) of 70% ethanol to the lysate and mix well by pipetting. Do not centrifuge. Proceed immediately to step 5.

Note: The volume of 70% ethanol to add may be less than 350  $\mu$ l if some lysate was lost during homogenization.

Note: Precipitates may be visible after addition of ethanol, but this does not affect the procedure.

2. Transfer the sample, including any precipitate that may have formed, to an RNeasy MinElute spin column placed in a 2 ml collection tube (supplied). Close the lid gently, and centrifuge for 15 s at  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10,000$  rpm). Discard the flow-through.\*

Optional: If recovery of protein is desired, keep the flow-through on ice and follow steps 1–5 in Appendix E on page 75.

Reuse the collection tube in step 3.

3. Add 350  $\mu$ l Buffer RW1 to the RNeasy MinElute spin column. Close the lid gently, and centrifuge for 15 s at  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10,000$  rpm) to wash the spin column membrane. Discard the flow-through.\* Reuse the collection tube in step 9.

Optional: If on-column DNase digestion is not desired, add 700  $\mu$ l Buffer RW1 instead, centrifuge for 15 s at  $\geq 8000 \times g$ , and discard the flow-through and collection tube.\*

4. Place the RNeasy MinElute spin column in a new 2 ml collection tube (supplied). Add 500  $\mu$ l Buffer RPE to the spin column. Close the lid gently, and centrifuge for 15 s at  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10,000$  rpm) to wash the spin column membrane. Discard the flow-through.

Reuse the collection tube in step 11.

Note: Buffer RPE is supplied as a concentrate. Ensure that ethanol is added to Buffer RPE before use (see “Things to do before starting”).

5. Add 500  $\mu$ l of 80% ethanol to the RNeasy MinElute spin column. Close the lid gently, and centrifuge for 2 min at  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10,000$  rpm) to wash the spin column membrane. Discard the flow-through and collection tube. Prepare 80% ethanol with ethanol (96–100%) and the RNase-free water supplied with the kit.

Note: After centrifugation, carefully remove the RNeasy MinElute spin column from the collection tube so that the column does not contact the flow-through. Otherwise, carryover of ethanol will occur.

\* Flow-through contains Buffer RLT and is therefore not compatible with bleach. See page 6 for Safety Information.

6. Place the RNeasy MinElute spin column in a new 2 ml collection tube (supplied). Open the lid of the spin column, and centrifuge at full speed for 5 min. Discard the flow-through and collection tube. To avoid damage to their lids, place the spin columns into the centrifuge with at least one empty position between columns. Orient the lids so that they point in a direction opposite the rotation of the rotor (e.g., if the rotor rotates clockwise, orient the lids counterclockwise). It is important to dry the spin column membrane because residual ethanol may interfere with downstream reactions. Centrifugation with the lids open ensures that no ethanol is carried over during RNA elution.
7. Place the RNeasy MinElute spin column in a new 1.5 ml collection tube (supplied). Add 14  $\mu$ l RNase-free water directly to the center of the spin column membrane. Close the lid gently, and centrifuge for 1 min at full speed to elute the RNA.

## ANEXO B

### Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit - Roche

#### Procedure B: cDNA Synthesis with anchored-oligo(dT)18 primer AND random hexamer primer

The following conditions describe a first-strand cDNA synthesis for a two-step RT-PCR with a mixture of anchoredoligo(dT)18 primer AND random hexamer primers.

1. Thaw the components listed below and place them on ice.
2. Briefly centrifuge all reagents before setting up the reactions.
3. Set up the reaction components in a nuclease free microcentrifuge tube placed on ice.

Template-Primer Mix (for 1 reaction)

Reagent	Volume	Final conc.
total RNA or poly (A)+mRNA	variable	1 µg total RNA *or 10 ng poly (A)+mRNA
Anchored-oligo(dT)18 Primer, 50 pmol/µl (Vial 5)	1 µl	2.5 µM
AND Random Hexamer Primer, 600 pmol/µl (Vial 6)	2 µl	60 µM
Water, PCR Grade (Vials 7 or 9)	variable	to make total volume = 13 µl
Total	13 µl	

4. Optional Step:  
Denature the template-primer mixture by heating the tube for 10 min at +65°C in a block cyclor with a heated lid (to minimize evaporation).
5. Immediately cool the tube on ice.
6. To the tube containing the template-primer mix, add the remaining components of the RT mix in the order listed below.

Reagent	Volume	Final conc.
Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer, 5x conc. (Vial 2)	4 µl	1x 8 mM MgCl <sub>2</sub>
Protector RNase Inhibitor, 40 U/µl (Vial 3)	0.5 µl	20 U
Deoxynucleotide Mix, 10 mM each (Vial 4)	2 µl	1 mM each
Transcriptor Reverse Transcriptase, 20U/µl (Vial 1)	0.5 µl	10 U
Total	20 µl	

7. Mix the reagents  
Do not vortex!  
Centrifuge briefly to collect the sample at the bottom of the tube.
8. Place the tube in a thermal block cyclor with a heated lid (to minimize evaporation).
9. Depending on the primer used and the length of the target mRNA, incubate the RT reaction as described in the table below:

If you are using...	And the target mRNA is...	Incubate the RT reaction
Anchored-oligo(dT) <sub>18</sub> Primer, 50 pmol/ml (Vial 5) AND Random Hexamer Primer, 600 pmol/μl	Up to 4 kb	10 min at 25°C followed by 30 min at 55°C
	>4 kb	10 min at 25°C followed by 60 min at 50°C

**10.** Inactivate Transcriptor Reverse Transcriptase by heating to 85° for 5 min, chill on ice.

At this point the reaction tube may be stored at +2 to +8°C for 1 - 2 h or at -15 to -25°C for longer periods.



## ANEXO C

### Tablas suplementarias

*Tabla suplementaria 1. Resultados de la obtención de islotes pancreáticos.*

Grupo	Nº animal	Edad	Genotipo	Nº islotes	Observaciones de la perfusión
G1	1	< 6 meses	Transgénico	122	
G1	2	< 6 meses	Transgénico	211	
G1	3	< 6 meses	Transgénico	238	
G1	4	< 6 meses		233	
G1	5	< 6 meses		155	
G1	6	< 6 meses	Transgénico	375	
G1	7	< 6 meses	Transgénico	203	
G1	8	< 6 meses	Transgénico	167	
G1	9	< 6 meses	Transgénico	132	Pinchado al final
G1	10	< 6 meses	Transgénico	85	Pinchado al final
G2	1	> 6 meses	Transgénico	378	
G2	2	> 6 meses		270	
G2	3	> 6 meses	Transgénico	237	
G2	4	> 6 meses	Transgénico	92	Pinchado al final
G2	5	> 6 meses	Transgénico	262	
G2	6	> 6 meses		51	Pinchado al final
G2	7	> 6 meses	Transgénico	301	
G2	8	> 6 meses	Transgénico	63	Pinchado al final
G2	9	> 6 meses	Transgénico	352	
G2	10	> 6 meses		155	Pinchado al final
G2	11	> 6 meses		379	
G2	12	> 6 meses		262	
G3	1	> 12 meses	Transgénico	118	
G3	2	> 12 meses		442	
G3	3	> 12 meses		107	
G3	4	> 12 meses	Transgénico	219	
G3	5	> 12 meses		190	
G3	6	> 12 meses		163	Pinchado al final
G3	7	> 12 meses	Transgénico	84	
G3	8	> 12 meses		317	
G3	9	> 12 meses		418	
G3	10	> 12 meses	Transgénico	257	
G3	11	> 12 meses		355	
G3	12	> 12 meses	Transgénico	293	
G3	13	> 12 meses	Transgénico	128	
G3	14	> 12 meses	Transgénico	180	
G4	1	> 24 meses		109	Pinchado al final
G4	2	> 24 meses	Transgénico	323	
G4	3	> 24 meses		257	
G4	4	> 24 meses	Transgénico	320	
G4	5	> 24 meses	Transgénico	211	
G4	6	> 24 meses		348	
G4	7	> 24 meses		256	
G4	8	> 24 meses	Transgénico	16	Pinchado al final
G4	9	> 24 meses	Transgénico	224	

**Tabla suplementaria 2. Resultados de la extracción de RNA.**

<b>Muestra</b>	<b>260</b>	<b>280</b>	<b>230</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>	<b>ng/μL</b>
G1_1	3,057	1,825	2,895	1,675	1,056	152,853
G1_2	7,087	3,856	21,892	1,838	0,324	354,342
G1_3	3,001	1,635	3,656	1,836	0,821	150,069
G1_4	2,62	1,44	12,174	1,819	0,215	131,002
G1_5	2,114	1,159	4,5	1,823	0,47	105,692
G1_6	2,926	1,586	24,153	1,846	0,121	146,324
G1_7	5,451	2,791	3,408	1,953	1,6	272,53
G1_8	2,46	1,413	2,059	1,741	1,194	122,978
G1_9	0,967	0,581	0,798	1,665	1,211	48,328
G1_10	1,155	0,71	4,311	1,628	0,268	57,774
G2_1	1,039	0,591	9,167	1,758	0,113	51,949
G2_2	2,188	1,263	2,705	1,732	0,809	109,381
G2_3	1,802	0,948	1,508	1,9	1,195	90,103
G2_4	0,885	0,534	1,618	1,658	0,547	44,258
G2_5	1,634	0,851	1,697	1,92	0,963	81,676
G2_6	0,718	0,426	11,449	1,686	0,063	35,912
G2_7	4,902	2,406	4,666	2,038	1,051	245,095
G2_8	1,821	0,964	7,851	1,889	0,232	91,045
G2_9	8,279	3,954	9,409	2,094	0,88	413,955
G2_10	4,417	2,331	7,119	1,895	0,62	220,861
G2_11	8,804	4,379	4,838	2,011	1,82	440,213
G2_12	7,319	3,622	8,768	2,021	0,835	365,928
G3_1	1,137	0,609	2,846	1,867	0,399	56,828
G3_2	6,773	3,254	5,117	2,081	1,324	338,632
G3_3	1,083	0,574	2,477	1,884	0,437	54,129
G3_4	31,638	15,685	15,999	2,017	1,978	1581,909
G3_5	1,237	0,625	1,083	1,978	1,142	61,864
G3_6	3,245	1,621	1,816	2,002	1,786	162,238
G3_7	1,149	0,689	0,87	1,667	1,32	57,433
G3_8	2,607	1,318	3,207	1,978	0,813	130,352
G3_9	5,1	2,47	6,673	2,064	0,764	254,995
G3_10	3,251	1,657	3,017	1,962	1,078	162,539
G3_11	16,327	7,865	8,606	2,076	1,897	816,349
G3_12	6,458	3,132	14,021	2,062	0,461	322,876
G3_13	2,779	1,447	4,452	1,921	0,624	138,956
G3_14	6,628	3,198	5,094	2,072	1,301	331,413
G4_1	1,795	0,968	52,706	1,855	0,034	89,765
G4_2	5,642	2,731	4,558	2,066	1,238	282,086
G4_3	1,876	0,957	2,581	1,96	0,727	93,808
G4_4	1,309	0,701	12,564	1,866	0,104	65,428
G4_5	1,101	0,621	2,467	1,773	0,446	55,041
G4_6	2,815	1,378	4,528	2,044	0,622	140,772
G4_7	4,363	2,123	7,534	2,055	0,579	218,143
G4_8	0,715	0,455	8,996	1,572	0,079	35,738
G4_9	1,297	0,772	1,166	1,681	1,112	64,866