

Efecto de la sobreexpresión de BCL-XL en la función y supervivencia de la célula β pancreática

Atenea Pérez Serna

Tutores:

Dra. Laura Marroquí Esclapez

Dr. Ángel Nadal Navajas

Máster en Biotecnología y Bioingeniería

Trabajo Fin de Máster

2019/2020

Dña. LAURA MARROQUÍ ESCLAPEZ, Doctora y Profesora Ayudante Doctor del Área de Fisiología de la Universidad Miguel Hernández de Elche, y **D. ÁNGEL NADAL NAVAJAS**, Doctor y Catedrático del Área de Fisiología de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

CERTIFICAN

Que el presente trabajo titulado:

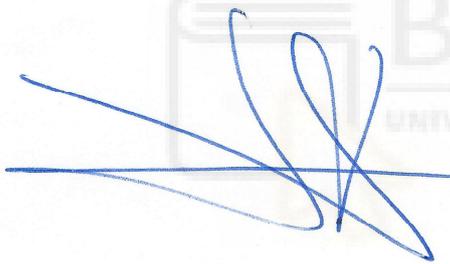
“Efecto de la sobreexpresión de BCL-XL en la función y supervivencia de la célula β pancreática”

y que constituye la Memoria del Trabajo Fin de Máster en Biotecnología y Bioingeniería, que presenta:

Dña. ATENEA ALEXANDRA PÉREZ SERNA

ha sido realizado bajo su supervisión en el Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDIIBE), cumpliendo todos los requisitos necesarios.

Y para que así conste, se expide y firma el presente certificado en Elche a 8 de julio de 2020



Fdo.: Prof. Laura Marroquí Esclapez



Fdo.: Prof. Ángel Nadal Navajas

Agradecimientos

Este trabajo no habría sido posible sin la inestimable ayuda y apoyo de mis mentores: la Dra. Laura Marroquí y el Dr. Ángel Nadal. Por su paciencia y su incansable dedicación a hacer de mí una mejor científica, pero también una mejor persona.

Durante este año, todas y cada una de las personas del laboratorio, del que me siento orgullosa de poder formar parte, han dedicado tiempo a ayudarme a crecer a nivel profesional y personal, desde las indispensables técnicas del laboratorio Luisi Navarro y Salomé Ramón hasta los investigadores posdoctorales, que, por suerte, son muchos para nombrarlos en este párrafo. Sin embargo, le debo mi más sincero agradecimiento por su ayuda en cada etapa de este trabajo al Dr. Reinaldo Sousa, sin quien este trabajo seguiría en mantillas, y a la Dr. Regla Medina y a Beatriz Bonmatí, por enseñarme la paz de espíritu imprescindible en la investigación científica. Por último, pero no menos importante, mi compañero de penas y formación los últimos dos años Ignacio Babiloni, que ha vivido mis triunfos y derrotas como si fueran suyos.

Este trabajo está dedicado a mis padres, Miguel y Ángela, quienes desde que empecé a caminar han sido mi constante apoyo y abrigo, e inculcaron en mí la curiosidad científica que ambos llevan dentro. Especialmente le debo el haber llegado hasta aquí a mi padre, porque si bien este es mi sueño, antes fue el suyo.

Resumen

La diabetes es una enfermedad crónica, con una alta tasa de mortalidad y morbilidad, que afecta a 463 millones de personas a nivel mundial, aunque la Federación Internacional de Diabetes estima que habrá 700 millones de casos en 2045. Los esfuerzos para ralentizar o frenar el transcurso de la diabetes se han centrado en limitar la respuesta inmune en la diabetes tipo 1 y reducir la insulinoresistencia en la diabetes tipo 2, pero los avances logrados no son suficientes para mantener una masa de célula β funcional capaz de mantener la normoglucemia. Durante el transcurso de la diabetes tipo 1 y diabetes tipo 2, las células β pancreáticas están expuestas a diferentes estímulos apoptóticos, que acaban provocando su disfunción y/o muerte, y la consecuente hiperglucemia.

Estudios previos demuestran que la mayor resistencia de la célula α pancreática a la apoptosis en condiciones de diabetes tipo 2 se debe, en parte, a su alta expresión de la proteína antiapoptótica BCL-XL en comparación a su expresión en la célula β . En este trabajo se postula que la sobreexpresión de BCL-XL en la célula β pancreática puede tener un efecto protector frente a la apoptosis en las condiciones observadas en la diabetes tipo 1 y diabetes tipo 2.

Para estudiar los efectos de la sobreexpresión de BCL-XL en la célula β , se sobreexpresó esta proteína mediante un vector adenoviral en dos líneas de célula β : INS-1E (de rata) y EndoC- β H1 (humana) logrando un aumento de 7 veces (INS-1E) y 5 veces (EndoC- β H1) sobre su respectiva expresión endógena. Se comprobó la sobreexpresión mediante inmunocitofluorescencia y análisis Western Blot. Se analizó el efecto de la sobreexpresión de BCL-XL en la función de la célula β mediante el análisis de las oscilaciones de Ca^{2+} intracelular y la secreción de insulina en respuesta a diferentes estímulos por microscopía de fluorescencia y ELISA, respectivamente. El efecto en la viabilidad celular se evaluó mediante tinción con Hoechst/PI. Las células se trataron en presencia de un estímulo proapoptótico de la diabetes tipo 1 (un cóctel de citoquinas proinflamatorias) o un estímulo de la diabetes tipo 2 (palmitato).

Los resultados indican que la sobreexpresión de BCL-XL reduce levemente la señal de Ca^{2+} intracelular y la función secretora de insulina en INS-1E, pero no afecta a la función secretora del modelo humano. La sobreexpresión de BCL-XL fue capaz de proteger un 40 % a INS-1E y un 99% a EndoC- β H1 frente a la apoptosis inducida por citoquinas, y un 73% frente a la inducida por palmitato en EndoC- β H1.

Los resultados de este trabajo indican que la sobreexpresión de BCL-XL no parece alterar la función secretora de la célula β humana. Además, la sobreexpresión de BCL-XL es capaz de proteger a la célula β en el microambiente proapoptótico de la diabetes tipo 1 y diabetes tipo 2. Los resultados expuestos en este trabajo abren la puerta a la búsqueda de otras estrategias de terapia génica en células β humanas que mejoren su viabilidad en diabetes.

Palabras clave: BCL-XL, sobreexpresión, célula β , función, supervivencia.

Abstract

Diabetes is a chronic disease with high mortality and morbidity which currently affects over 463 million people worldwide. More importantly, the International Diabetes Federation estimates that diabetes will reach 700 million cases by 2045. Efforts to delay or slow down the progression of diabetes have focused on limiting the immune response in type 1 diabetes and reducing insulin resistance in type 2 diabetes. However, what has been achieved so far is insufficient to keep enough functional β -cell mass to maintain normoglycemia. During type 1 diabetes and type 2 diabetes, pancreatic β -cells are exposed to different apoptotic stimuli, which eventually cause β -cell dysfunction and/or death and, consequently, hyperglycaemia.

Previous studies have demonstrated that the higher resistance against type 2 diabetes conditions shown by pancreatic α -cells may be due, at least partially, to their higher expression of the antiapoptotic protein BCL-XL compared to β -cells. In this project we postulate that BCL-XL overexpression in β -cells might have a protective effect against apoptotic conditions observed in type 1 diabetes and type 2 diabetes.

To study the effects of BCL-XL overexpression in β -cells, we used an adenoviral vector to overexpress BCL-XL in two β -cell lines: INS-1E (rat) and EndoC- β H1 (human), reaching a 7 times (INS-1E) and 5 times (EndoC- β H1) increase in BCL-XL expression over their respective endogenous levels. Overexpression was confirmed by immunocytofluorescence and Western Blot. BCL-XL overexpression effects on β -cell function were assessed in response to different stimuli by measuring intracellular Ca^{2+} by fluorescence microscopy and insulin secretion by ELISA. Cellular viability was assessed by Hoechst/PI staining. Cells were treated either with a type 1 diabetes proapoptotic stimulus (a proinflammatory cytokine cocktail) or a type 2 diabetes stimulus (palmitate).

Our results show that BCL-XL overexpression slightly reduces intracellular Ca^{2+} responses as well as insulin secretion in rat but not insulin secretion in human β -cells. BCL-XL overexpression reduced cytokine-induced β -cell apoptosis by 40 % (INS-1E cells) and 99 % (EndoC- β H1 cells). Palmitate-induced apoptosis was reduced by 73 % in EndoC- β H1.

Our findings suggest that BCL-XL overexpression does not seem to affect human β -cell secretory capacity. Moreover, BCL-XL overexpression protects pancreatic β -cells against the proapoptotic microenvironment observed in type 1 diabetes and type 2 diabetes. The results presented herein open the doors to the search for other strategies based on the modulation of gene expression to improve human β -cell survival in diabetes.

Keywords: BCL-XL, overexpression, β -cell, function, survival.

Abreviaturas

0 G: 0 mM glucosa	20 G: 20 mM glucosa	DNA: ácido desoxirribonucleico
AMPc: adenosín monofosfato cíclico	AUC: área bajo la curva	BSA: albúmina de suero bovino
Cas3: caspasa 3	Cas7: caspasa 7	Cas9: caspasa 9
CMV: citomegalovirus	DMSO: dimetilsulfóxido	ER: Retículo endoplasmático
FBS: suero bovino fetal	GSIS: secreción de insulina estimulada por glucosa	HEPES: ácido hidroxietil piperazineetanosulfónico
HIV-1: Virus de la inmunodeficiencia humana 1	IBMX: 3-isobutil-1-metilxantina	ICF: inmunocitofluorescencia
IDF: Federación internacional de diabetes	IFN-γ: interferón gamma	IGF-1: factor de crecimiento similar a insulina 1
IL-1β: Interleuquina 1 β	iNOS: sintasa de óxido nítrico	IP₃: Inositol trifosfato
JNK: quinasa c-Jun N-terminal	MPT: transición de permeabilidad mitocondrial	MOMP: Permeabilización de la membrana externa mitocondrial
NAD(P)H: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato	NT: no tratado	Palm: palmitato
PBS: tampón fosfato salino	PI: yoduro de propidio	RNA: ácido ribonucleico
SERCA: Ca ²⁺ -ATPasa del retículo endoplasmático	T1D: Diabetes tipo 1	T2D: Diabetes tipo 2
u.a.: unidades arbitrarias	UPR: Respuesta a proteínas desplegadas	Veh: vehículo
VDAC1: canal aniónico dependiente de voltaje 1	VDCC: Canales de Ca ²⁺ dependientes de voltaje	v/v: volumen/volumen
WB: Western Blot	w/v: peso/volumen	

Índice

Portada	1
Declaración de los tutores	2
Agradecimientos	3
Resumen	4
Abstract	5
Abreviaturas	6
Índice	7
Introducción y Antecedentes	8
Objetivos	18
Procedimiento experimental	19
Manejo y uso de líneas celulares	19
Sobreexpresión de BCL-XL	21
Inmunocitofluorescencia	22
Registro de Ca ²⁺ intracelular	23
Secreción de insulina estimulada por glucosa	24
Tratamientos	25
Evaluación de la viabilidad celular	27
ELISA	28
Ensayo Bradford	29
Western Blot	29
Análisis estadístico	30
Resultados	31
Sobreexpresión de BCL-XL	31
Evaluación de la función celular	34
Respuesta de Ca ²⁺ intracelular	34
Secreción de insulina estimulada por glucosa	38
Evaluación de la viabilidad celular	40
Discusión y conclusiones	44
Bibliografía	50
Anexo I	59

Introducción y Antecedentes

El páncreas es un órgano secretor implicado en el metabolismo, tanto a nivel endocrino como exocrino. En su mayor parte está constituido por un parénquima exocrino, que facilita la digestión excretando enzimas digestivas y bicarbonato al duodeno. El páncreas endocrino está organizado en micro-órganos secretores conocidos como islotes de Langerhans, distribuidos heterogéneamente en el volumen pancreático.

Estos micro-órganos esféricos tienen un diámetro de 200-300 μm , y contienen de 1000 a 2500 células (Rorsman and Ashcroft, 2018). Además de macrófagos residentes e inervaciones neurovasculares, los islotes contienen cinco tipos de células especializadas en la secreción de hormonas implicadas en el metabolismo de la glucosa.

Los dos tipos celulares más estudiados del páncreas endocrino son las células α , secretoras de glucagón, y las células β , secretoras de insulina, ya que constituyen la mayor parte de la población celular del islote tanto en el ser humano como en rata y ratón (Figura 1), los modelos animales por excelencia en diabetología.

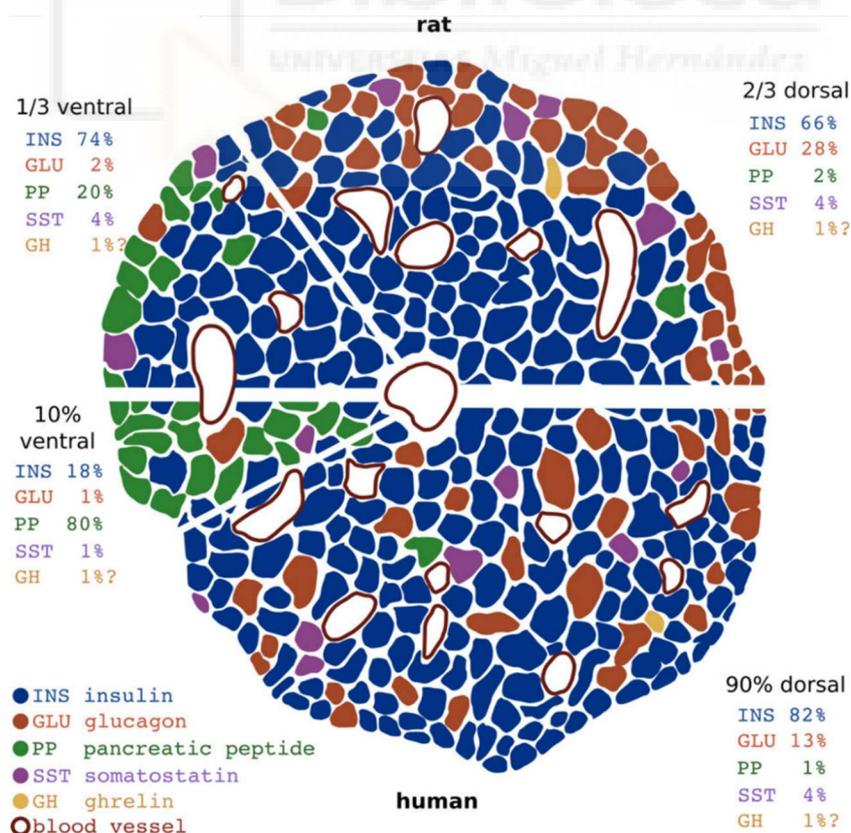


Figura 1. Esquema comparativo de la citoarquitectura del islote de Langerhans de rata (mitad superior) y humano (mitad inferior). Representa un corte histológico en el que se

detallan las proporciones de cada tipo celular en función de la principal hormona que secretan, así como la distribución y diferencias entre los islotes situados en las zonas ventral y dorsal pancreáticas. Tomado de: Suckale J & Solimena M., 2008.

La función secretora de insulina de la célula β es esencial para la supervivencia del organismo y, por lo tanto, debe mantenerse en condiciones óptimas durante toda la vida. En los humanos, la población de célula β es prácticamente constante a lo largo de la vida, siendo la neogénesis y la muerte celular eventos poco frecuentes (Rhodes, 2005). Cuando la función y/o la masa de célula β pancreática disminuyen, se desencadena una serie de sucesos complejos a nivel del organismo que dan lugar al inicio de la diabetes.

La diabetes es una enfermedad crónica, caracterizada por la incapacidad del páncreas endocrino de secretar insulina, o de secretarla en cantidad insuficiente para mantener la homeostasis de la glucosa. Este fallo conduce a la hiperglucemia, o concentración elevada de glucosa en sangre. Actualmente, la diabetes no tratada sigue siendo una enfermedad letal, ya que la hiperglucemia sostenida a largo plazo provoca graves daños en múltiples órganos y tejidos, con complicaciones como neuro y nefropatías, retinopatías, y daño micro y macrovascular.

Según la estimación de 2019 de la Federación Internacional de Diabetes, 463 millones de adultos padecen diabetes en el mundo, la mitad de los cuales no están diagnosticados. La prevalencia de esta enfermedad va en aumento, y se espera que alcance los 700 millones de casos en 2045 (IDF, 2019).

Existen dos tipos principales de diabetes atendiendo a su etiología: la diabetes tipo 1 y la diabetes tipo 2. La diabetes tipo 1 se caracteriza por un ataque autoinmune y selectivo a las células β pancreáticas, generalmente antes de los 18 años. Este ataque se produce en individuos con predisposición genética, y se desencadena por un detonante ambiental, con gran probabilidad causado por una infección viral (Richardson and Morgan, 2018). Existen más de 50 regiones genéticas asociadas al riesgo de padecer diabetes tipo 1, y más de un 80 % de ellas se expresan en el páncreas endocrino y las células β (Eizirik et al., 2012; Marroquí et al., 2015 a). Muchos de estos loci regulan etapas clave en el reconocimiento de señales de peligro e inmunidad innata. En la patogénesis de la diabetes tipo 1, los islotes de Langerhans sufren la infiltración de linfocitos T autorreactivos y macrófagos. El sistema inmune ataca específicamente a las células β gracias al reconocimiento de neoantígenos que las células β presentan en su superficie celular (Eizirik, Pasquali and Cnop, 2020). Estos son antígenos peptídicos no expuestos con anterioridad al sistema inmune, que generan una fuerte respuesta durante las primeras etapas de la infiltración inmunitaria.

Las citoquinas y quimioquinas secretadas por linfocitos, macrófagos y la propia célula β (Eizirik et al., 2012) generan una inflamación local de los islotes conocida como insulinitis, inducen estrés de retículo endoplasmático (ER) y activan vías proapoptóticas en la célula β (Cnop et al., 2005). En este microambiente proinflamatorio, los linfocitos T citotóxicos inducen la apoptosis por secreción de perforinas y granzimas (Gysemans, Callewaert, Overbergh and Mathieu, 2008), y a través de la señalización Fas/FasL por contacto directo con las células β . Cuando el 80% de la masa de célula β ha sido eliminada, la capacidad secretora de la población celular restante es incapaz de mantener la normoglucemia y se produce el debut clínico de la enfermedad (Vincenz et al., 2011).

En este complejo escenario, se establece una comunicación multidireccional entre linfocitos, macrófagos y células β , mediada a través del efecto de las quimioquinas y de las citoquinas. La interleuquina 1β (IL- 1β) y el interferón γ (IFN- γ) son dos de las principales citoquinas secretadas por macrófagos y linfocitos, respectivamente. Por sí mismas, no producen un efecto deletéreo en la célula β (Gysemans, Callewaert, Overbergh and Mathieu, 2008), pero su combinación tiene un efecto sinérgico fuertemente proapoptótico (Gurzov and Eizirik, 2011).

La combinación de IFN- γ e IL- 1β activa diferentes vías de señalización: la vía JNK, la inducción de iNOS (óxido nítrico sintasa inducible) y el aumento del estrés de ER a través de NF κ B inhiben proteínas de la familia BCL-2 antiapoptóticas como BCL-XL y Mcl-1 (Eizirik, Colli and Ortis, 2009) (Figura 2). Además, la señalización a través del receptor de IFN- γ activa la vía JAK/STAT-1, por la que se modula la expresión de genes de respuesta primaria al estrés (Gysemans, Callewaert, Overbergh and Mathieu, 2008). Si el estrés inducido por las citoquinas no es rápidamente revertido, se alcanza un punto de no retorno en la inducción de la vía intrínseca de la apoptosis.

Por otra parte, la diabetes tipo 2, que supone aproximadamente el 90% de los casos de diabetes a nivel mundial (IDF, 2019), se caracteriza por una disminución progresiva de la función y masa de la célula β pancreática debido al estrés metabólico.

Aunque se han determinado diferentes loci de susceptibilidad a diabetes tipo 2 (Cnop et al., 2013), el ambiente juega un mayor papel en su patogénesis. Los dos factores de riesgo de la diabetes tipo 2, insulinoresistencia sistémica y secreción de insulina deficiente, se dan en grupos de población en aumento: personas con obesidad abdominal, sobrepeso, y de edad avanzada, entre otros (IDF, 2019). El estilo de vida sedentario y una dieta hipercalórica rica en grasas saturadas son dos grandes factores de predisposición para la diabetes tipo 2 (Cnop et al., 2005), favoreciendo la resistencia

a la insulina en órganos y tejidos periféricos y forzando a la célula β a poner en marcha mecanismos compensatorios de síntesis y secreción de insulina.

Cuando la insulinoresistencia se cronifica, estos mecanismos adaptativos terminan por fallar por disfunción de la célula β , produciéndose un acoplamiento deficiente entre la detección de la glucosa y la respuesta secretora de insulina (Cerf, 2013). Como consecuencia, la secreción de insulina es insuficiente e incapaz de suplir los requerimientos metabólicos del organismo, produciéndose la hiperglucemia.

La disfunción de la célula β es consecuencia del aumento de estrés de ER por la alta demanda de síntesis, plegamiento y procesamiento de proinsulina en las condiciones de estrés metabólico características de la obesidad. Esto se evidencia en el aumento de volumen del orgánulo (Marroquí et al., 2015 b) y la acumulación tóxica de proteínas mal plegadas de polipéptido amiloide (Costes, 2018) en islotes de pacientes de diabetes tipo 2.

La hiperglucemia produce glucotoxicidad en la célula β , aumentando el estrés oxidativo y la producción de especies reactivas de oxígeno para metabolizar el exceso de glucosa (Poitout and Robertson, 2008). Simultáneamente la concentración fisiopatológica de palmitato en diabetes tipo 2 induce la apoptosis en un proceso conocido como lipotoxicidad, en el que se observa la activación de vías de estrés de ER, además del agotamiento de la reserva de Ca^{2+} del orgánulo (Cunha et al., 2008; Gurzov and Eizirik, 2011). De esta forma, la masa de célula β disminuye con el transcurso de la diabetes tipo 2, siendo la apoptosis de células β la consecuencia final de su disfunción, y no la causa de la diabetes tipo 2 (Rahier et al., 2008).

Al igual que en el caso de la diabetes tipo 1, el estrés de ER aumenta la expresión de proteínas de la familia BCL-2, como PUMA y DP5, que favorecen la apoptosis (Figura 2), e inhibe las antiapoptóticas MCL-1 y BCL-XL, siguiendo la vía intrínseca de la apoptosis hasta la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP, del inglés *Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*).

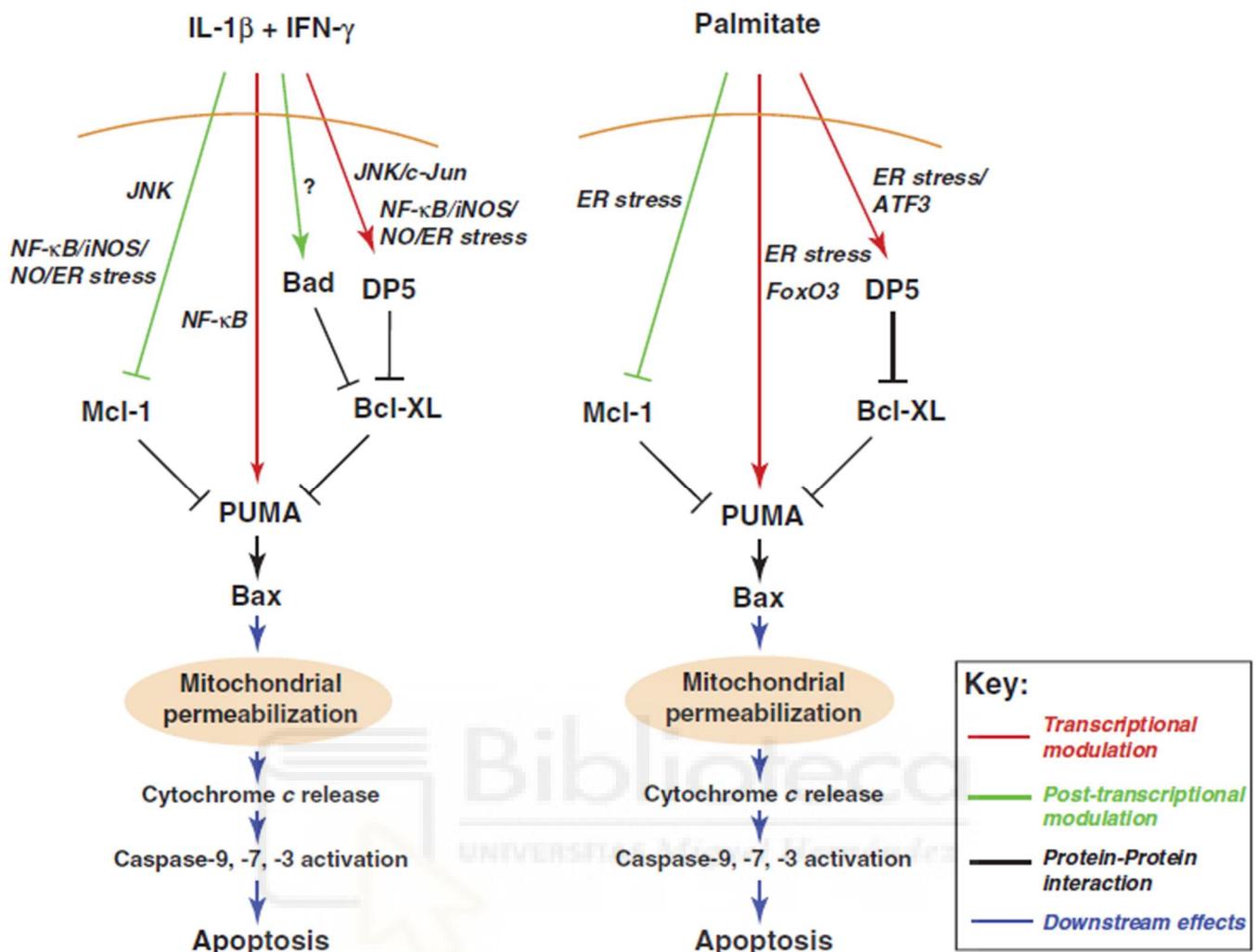


Figura 2. Vías de señalización de apoptosis mitocondrial en célula β pancreática. Vías inducidas por citoquinas proinflamatorias IL-1 β e IFN- γ (izquierda) y por lipotoxicidad del palmitato (derecha). Editado de: Gurzov and Eizirik, 2011.

En la vía intrínseca de la apoptosis, las proteínas de la familia BCL-2 juegan un papel fundamental. Su equilibrio determina si una vez detectado un estímulo proapoptótico, la célula prosigue o no hacia la muerte celular por MOMP. Este equilibrio depende en gran medida de la duración de la señal proapoptótica (Grunnet et al., 2009).

Estímulos como el estrés de ER y las citoquinas proinflamatorias son detectados por proteínas de la familia BCL-2 denominadas sensibilizadoras “BH3-only”, al ser éste el único dominio, de los cuatro que identifican a la familia (BH1 a BH4), en el cual conserva homología con los demás miembros (Alberts et al., 2010).

La detección del estímulo proapoptótico activa las proteínas sensibilizadoras “BH3-only” a nivel transcripcional, como es el caso de DP5, o mediante desfosforilación, como

ocurre en la proteína BAD (Gurzov and Eizirik, 2011). Una vez activadas, inhiben el secuestro de proteínas activadoras “BH3-only” al competir específicamente por su sitio de unión en proteínas antiapoptóticas, como BCL-XL o BCL-2, que se encuentran principalmente en la superficie del ER y mitocondrias (Figura 3).

La liberación de proteínas activadoras de la apoptosis como BIM, PUMA o t-BID (la forma truncada de BID), tiene un doble efecto. Por una parte, el modelo jerárquico propone que su unión a proteínas proapoptóticas como BAX y BAK induce la activación de estas últimas mediante un cambio conformacional. La homo-oligomerización de estas proteínas en la superficie de la membrana externa mitocondrial genera un poro que libera las proteínas de la matriz, entre ellas el citocromo c (Scorrano and Korsmeyer, 2003).

Este es un punto de no retorno, ya que una vez liberado al citoplasma, el citocromo c se une a la proteína adaptadora activadora de procaspasas Apaf-1, generando un complejo proteico denominado apoptosoma. El apoptosoma recluta y activa caspasas 9 (Cas9) activadoras, que a su vez procesan a caspasas efectoras 3 (Cas3) y 7 (Cas7), iniciando la apoptosis (Alberts et al., 2010).

En cambio, el modelo de activación indirecta propone que el propósito de todas las proteínas “BH3-only” es impedir la interacción entre la proteína inhibidora de la apoptosis BCL-XL y las proteínas BAX y BAK, inherentemente activas (Billen et al., 2008).

Ambos procesos se dan en la célula β , y se ha comprobado que BCL-XL inhibe la MOMP de dos maneras distintas: 1) al competir con la forma monomérica de BAX por la unión a la proteína activadora t-BID; y 2) al unirse a monómeros de BAX, impidiendo que BAX oligomerice (Billen et al., 2008). Además, actúa trasladando BAX al citosol (Banjara, Suraweera, Hinds and Kvensakul, 2020).

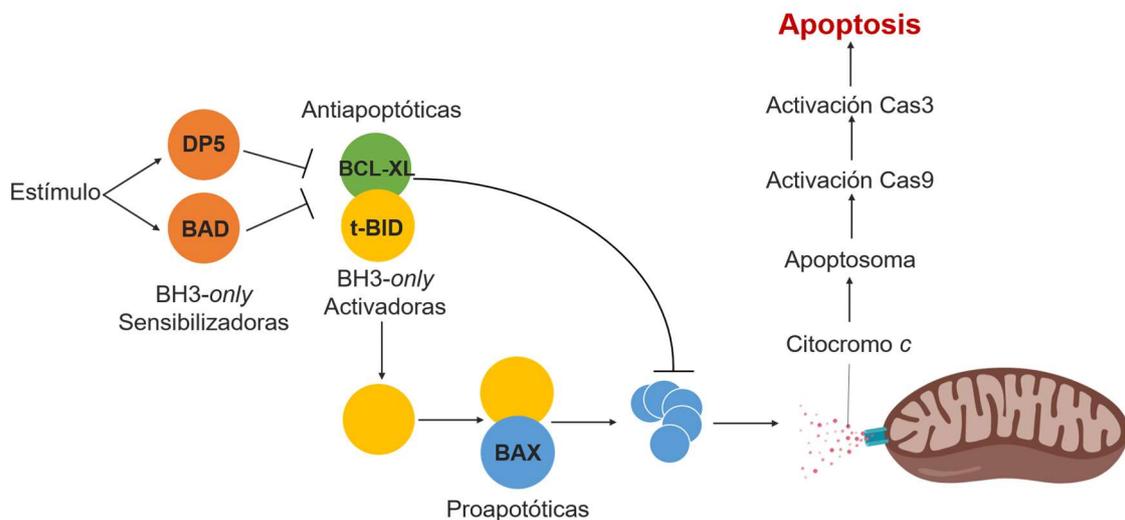


Figura 3. Representación esquemática de los modelos jerárquico y de activación indirecta en la regulación de la vía intrínseca de la apoptosis. Cuando un estímulo proapoptótico es detectado por las proteínas BCL-2 BH3-*only* como DP5 y BAD. Su activación libera a las proteínas BH3-*only* como t-BID de las proteínas antiapoptóticas, al unirse competitivamente a estas últimas (proteína antiapoptótica BCL-XL en la figura). Las proteínas activadoras liberadas inducen un cambio conformacional en las proapoptóticas, permitiéndoles oligomerizar en la membrana externa de la mitocondria y formar un poro. La liberación al citoplasma del citocromo c permite la formación del apoptosoma y la activación de las caspasas 9 y 3, iniciando la apoptosis.

Un hecho a destacar es que la célula α pancreática no entra en apoptosis en diabetes tipo 1 ni en diabetes tipo 2, aunque esté expuesta al mismo ambiente proapoptótico que la célula β , y muestre las mismas señales de estrés de ER. La célula α de rata expresa significativamente más BCL-XL y BCL-2 que la célula β , tanto basalmente como en respuesta a una concentración fisiopatológica de palmitato (Marroquí et al., 2015 b, Figura 4), llegando a una expresión de BCL-XL 7 veces mayor que la de la célula β en condiciones basales. Además, el silenciamiento del ARN mensajero de la proteína BCL-XL pero no de BCL-2 equipara los niveles de apoptosis inducida por palmitato.

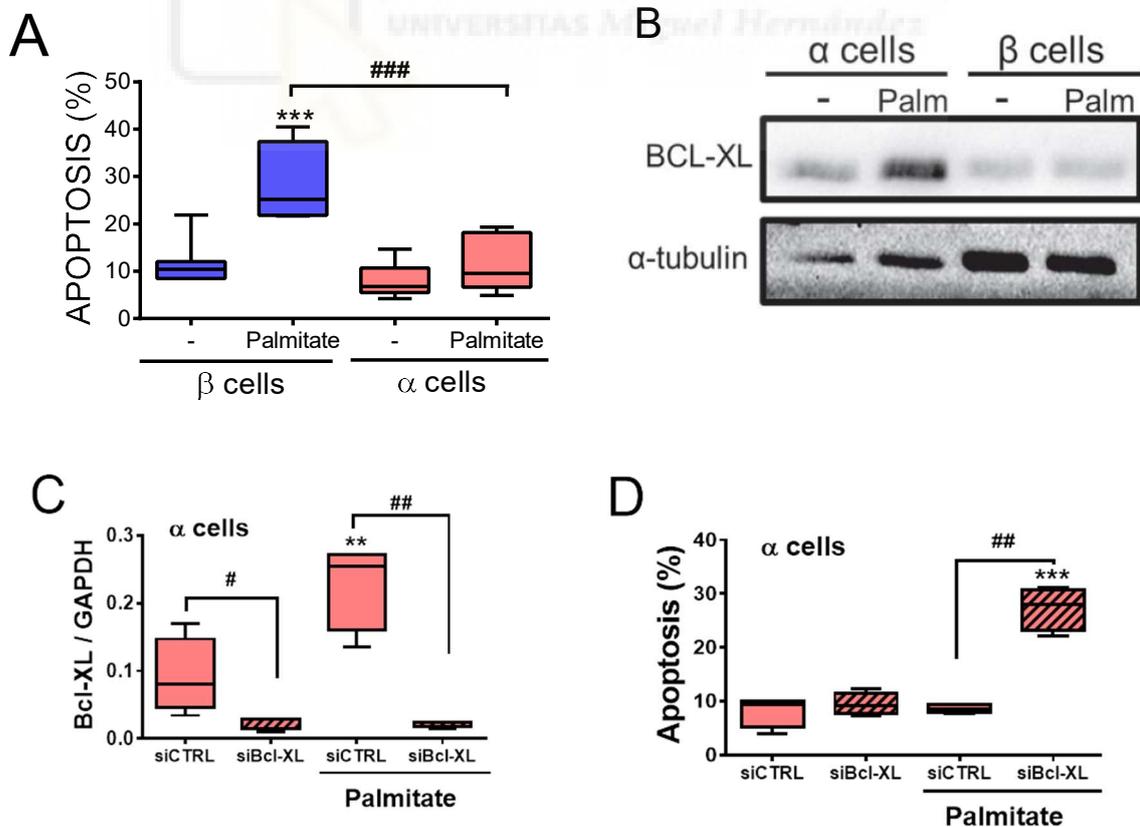


Figura 4. La célula α pancreática de rata es resistente a apoptosis inducida por palmitato en comparación con la célula β , gracias a su mayor expresión de BCL-XL. (A) El porcentaje de apoptosis inducido por palmitato (Palm) es significativo respecto al control en célula β a diferencia de en célula α , y es significativamente mayor que en célula α en presencia de palmitato. (B) La célula α sobreexpresa BCL-XL en presencia de palmitato. (C y D) La inhibición mediante RNA de interferencia (siRNA) en célula α equipara los valores de apoptosis inducida por palmitato a los de la célula β . Tomado de Marroquí et al., 2015 b.

Resulta de especial interés plantearse si la mayor supervivencia de la célula α pancreática frente a estímulos proapoptóticos característicos de los dos tipos de diabetes predominantes podría emularse en la célula β , ya que una aproximación terapéutica que lograse evitar o disminuir la pérdida de masa de célula β podría retrasar o evitar el desarrollo de diabetes. Basado en los resultados descritos previamente, la proteína antiapoptótica BCL-XL parece ser un blanco terapéutico prometedor. Esta proteína forma parte de la familia de proteínas BCL-2, reguladoras esenciales de la vía intrínseca de la apoptosis.

BCL-XL es una de las dos proteínas que rinde por *splicing* alternativo del exón 2 del gen *BCL2L1* (BCL-2 like 1), localizado en el cromosoma 20q11.21 (Stevens and Oltean, 2019). La traducción de *BCL2L1* da lugar a la proteína BCL-XL (BCL-X long isoform) de 233 aminoácidos y a BCL-XS (BCL-X short isoform) de 170 aminoácidos. Esta última antagoniza mediante su unión la función antiapoptótica de BCL-XL y de BCL-2, pero su *splicing* alternativo está fuertemente regulado, favoreciendo en condiciones normales una alta relación BCL-XL/BCL-XS (Michels et al., 2013). A diferencia de la isoforma corta de BCL-X, BCL-XL conserva los 4 dominios de homología característicos de la familia BCL-2.

Es una proteína monomérica de 25 kDa, compuesta por 8 hélices α (Figura 5) y un segmento transmembrana en su extremo C-terminal que le permite anclarse a las membranas de diferentes orgánulos, como la membrana del ER, la membrana citoplasmática o la envuelta nuclear. Principalmente colocaliza con la mitocondria, donde ejerce su función antiapoptótica (Luciani et al., 2013).

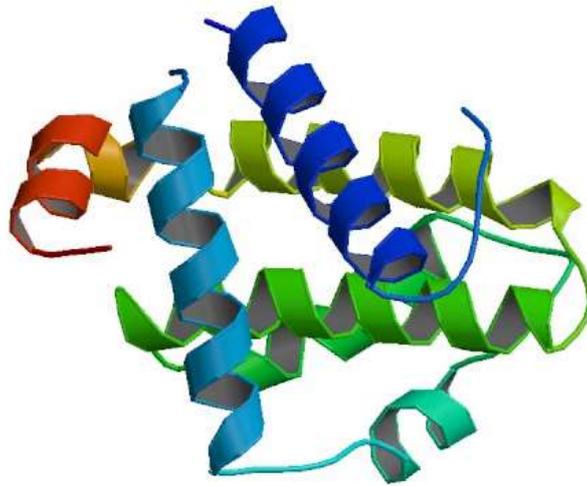


Figura 5. Estructura tridimensional de BCL-XL, obtenida por difracción de rayos X. Está constituida por una única cadena aminoacídica que da lugar a 8 hélices α . PDB: 1MAZ. (Muchmore et al., 1996).

La función antiapoptótica de BCL-XL consiste en su capacidad para secuestrar a proteínas de la familia BCL-2 activadoras de la apoptosis y proapoptóticas, inhibiendo la formación de poros en la membrana mitocondrial externa, cuya formación supone un paso irreversible en la vía intrínseca de la apoptosis. Además, BCL-XL es capaz de unirse y secuestrar a p53, de conocida actividad proapoptótica, por lo que en células tumorales su sobreexpresión induce resistencia a la quimioterapia. Su unión al canal aniónico VDAC1 (canal aniónico dependiente de voltaje 1) en la membrana mitocondrial externa, inhibe la transición de permeabilidad mitocondrial (MPT), un fenómeno proapoptótico por el cual aumenta abruptamente la permeabilidad a solutos pequeños en la membrana mitocondrial interna (Michels et al., 2013).

BCL-XL es una proteína esencial para la supervivencia y función de diversos tipos celulares: su acción es crítica en la supervivencia y función de las plaquetas (Mason et al., 2007; Harper and Poole, 2012), regula negativamente la formación del inflammasoma (Faustin et al., 2009) y favorece el establecimiento de las sinapsis neuronales al inducir la actividad GTP-asa de DRP1 y la consecuente fisión mitocondrial (Li et al., 2008).

Esta relación también se encuentra en la célula β pancreática. Un estudio de 2004 de Chen et al., demostró que el factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF-1) es capaz de proteger frente a la diabetes tipo 1 a ratones diabéticos no obesos, disminuyendo la apoptosis en células β al aumentar la expresión de BCL-2 y BCL-XL. Por otra parte, el silenciamiento del gen *BCL2L1* en islotes de ratón induce hipersensibilidad a citoquinas proinflamatorias (Carrington et al., 2009) y el aumento de su expresión en célula β

mediante un vector adenoviral inhibe el efecto deletéreo de las citoquinas y la sobreproducción de óxido nítrico (Hololan et al., 2008).

La función de BCL-XL no es sólo importante en células β adultas, su expresión es también fundamental en la supervivencia de las células pancreáticas durante los procesos de diferenciación de células madre pluripotenciales (Loo et al., 2020).

Su capacidad para limitar los efectos deletéreos del estrés en la célula β pancreática humana fue probada por Klein et al. en 2004. Estos investigadores demostraron que la inserción de la proteína BCL-XL o de su subunidad BH4 en un constructo con el péptido de penetración celular de HIV-1 era capaz de inhibir la apoptosis en islotes humanos, mejorando su viabilidad para trasplante.



Objetivos

El objetivo principal de este trabajo toma como referencia los resultados obtenidos por Marroquí et al., 2015 (b). Los autores demostraron que, frente a un estrés metabólico como la concentración fisiopatológica de palmitato característica de la diabetes tipo 2, el estrés de ER en la célula α es igual o superior al de la célula β pancreática. También probaron que la mayor expresión de la proteína antiapoptótica BCL-XL en la célula α , tanto en condiciones basales como de estrés metabólico, protegía a este tipo celular de la apoptosis inducida por palmitato.

Por tanto, consideramos que la mayor expresión de BCL-XL en la célula α pancreática puede estar jugando un papel fundamental en la supervivencia de este tipo celular en el microambiente proapoptótico del islote en diabetes tipo 1 y diabetes tipo 2. Bajo este supuesto, proponemos que la sobreexpresión de BCL-XL en la célula β pancreática puede tener un efecto protector frente a la apoptosis en las condiciones características de la diabetes tipo 1 y diabetes tipo 2.

El objetivo principal de este trabajo es evaluar el efecto en la viabilidad y función de la célula β al sobreexpresar BCL-XL mediante un vector adenoviral, en dos modelos celulares de célula β : EndoC- β H1 e INS-1E, de origen humano y de rata, respectivamente. Para ello, se abordarán los siguientes objetivos secundarios:

- 1) Optimizar un sistema de sobreexpresión de BCL-XL basado en la infección con vectores adenovirales, confirmando la sobreexpresión de BCL-XL mediante Western Blot e inmunocitofluorescencia (ICC), y determinando la inocuidad de la carga viral utilizada mediante la tinción Hoechst 33342/yoduro de propidio.
- 2) Analizar el efecto de la sobreexpresión de BCL-XL en las oscilaciones de Ca^{2+} intracelular en respuesta a estímulos secretores: concentración estimuladora y no estimuladora de glucosa, y cloruro potásico.
- 3) Analizar la función secretora de insulina de las células con sobreexpresión de BCL-XL frente a diferentes estímulos mediante ELISA.
- 4) Evaluar la viabilidad celular empleando la tinción Hoechst 33342/yoduro de propidio de células β con sobreexpresión de BCL-XL por infección con un vector adenoviral, en condiciones que simulen la insulinitis de la diabetes tipo 1 (mediante un cóctel de citoquinas) y la lipotoxicidad de la diabetes tipo 2 (mediante una concentración fisiopatológica de palmitato).

Procedimiento experimental

Manejo y uso de líneas celulares

En este trabajo se emplearon dos líneas celulares de célula β pancreática: INS-1E, obtenida de insulinoma de rata (Asfari et al., 1992) y EndoC- β H1, obtenida de yemas pancreáticas embrionarias humanas (Ravassard et al., 2011).

Para el crecimiento y uso de la línea celular INS-1E (cedida por el Dr. C. Wollheim, Departamento de Fisiología Celular y Metabolismo, Universidad de Ginebra, Ginebra, Suiza), se utilizó medio RPMI 1640 suplementado tal como se describe en la Tabla 1 del Anexo 1.

En los experimentos, se sembraron las células INS-1E en placas de 96 pocillos de plástico Nunc (T-C plate 96-well, SARSTEDT) o en cubreobjetos recubiertos de polilisina (Sigma) para los experimentos de registro de Ca^{2+} intracelular. Se utilizaron las células hasta el pase 80.

En el caso de la línea celular EndoC- β H1 (Univercell-Biosolutions), el mantenimiento y siembra de células para experimentos se realizó utilizando medio completo OPTI β 1 (Endocells, Univercell-Biosolutions). Las células se sembraron sobre un recubrimiento de Matrigel (fibronectina + matriz extracelular, Univercell-Biosolutions) en placas de 96 pocillos (TPP, *Tissue Culture Cell Plasticware*) o en cubreobjetos de vidrio estéril recubiertos con Matrigel para los registros de Ca^{2+} intracelular.

El Matrigel se preparó diluyendo 120 μL de matriz concentrada β COAT (Univercell-Biosolutions) en 9.9 mL de medio DMEM (Gibco) con concentración 4.5 g/L de glucosa (Sigma) y 100 μL de solución 100x Penicilina/Estreptomina (Gibco). Se trabajó con células hasta el pase 80.

Los cultivos se mantuvieron a unas condiciones estables de 37°C, 95% humedad y 5% CO_2 . Para los experimentos de registro de Ca^{2+} , viabilidad y secreción, se sembraron diferentes densidades celulares según el tipo celular (Tabla 1).

	INS-1E	EndoC- β H1
Registro Ca^{2+} (células/cubreobjetos)	$1.5 \cdot 10^5$	$1.5 \cdot 10^5$
Viabilidad (células/pocillo)	$1.5 \cdot 10^4$	$4.5 \cdot 10^4$
Secreción (células/pocillo)	$1.5 \cdot 10^4$	$7.0 \cdot 10^4$

Tabla 1. Número de células sembradas por pocillo para los experimentos de imagen de Ca^{2+} intracelular, viabilidad y secreción en las líneas celulares INS-1E y EndoC- β H1.

Sobreexpresión de BCL-XL

Para sobreexpresar la proteína BCL-XL se infectaron células INS-1E y EndoC- β H1 con un vector adenoviral, adBcl-XL (Ad5-CMV-bcl2-1, Sirion, Alemania) que contenía un plásmido con el gen Bcl-XL de rata NM_001033672, bajo el promotor de CMV. Paralelamente, se infectaron células de ambas líneas celulares con el vector adenoviral adLuc (Ad-CMV-Luc2, Sirion, Alemania), que contenía un plásmido idéntico para la expresión del gen de la luciferasa como control negativo.

Se diluyeron los virus mediante titulación a una concentración de 5 virus por célula (o M.O.I. 5: multiplicidad de infección 5). Para ello, se calculó el número de células del pocillo o del cubreobjetos como las células sembradas inicialmente por el número de divisiones ocurridas en 72 horas. El tiempo medio de duplicación es específico de cada línea celular: para INS-1E es de 36 horas y para EndoC- β H1 es de 96 horas.

Para su infección, las células se incubaron durante 3 horas a 37°C con la concentración de virus calculada en función de la densidad celular en 100 μ L de medio de infección. La composición del medio de infección para INS-1E es la misma que la del medio completo, pero carece de antibióticos. La composición del medio de infección para EndoC- β H1 está descrita en la Tabla 2 del Anexo 1.

Transcurrido el tiempo de incubación, se cambió el medio de infección con medio completo de cultivo en el caso de las células INS-1E o medio completo suplementado con 2% v/v FBS en las células EndoC- β H1. Los experimentos se realizaron semanalmente, siguiendo el cronograma a continuación (Figura 6).

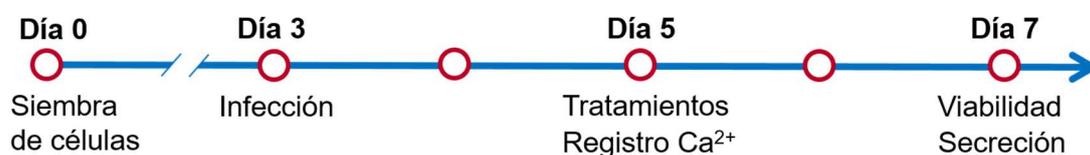


Figura 6. Cronograma semanal de experimentos con líneas celulares. Secuencialmente: 72 horas después de su siembra, se sobreexpresó BCL-XL en las células mediante infección con vectores adenovirales. 48 horas post-infección, se aplicaron los tratamientos, cuya duración fue de 48 horas, o bien se realizaron los registros de Ca²⁺ intracelular. Finalmente, se realizaron los ensayos de viabilidad y secreción de insulina. La efectiva sobreexpresión de BCL-XL se comprobó mediante ICF y/o WB. El resultado del ensayo de secreción de insulina se evaluó mediante ELISA.

Inmunocitofluorescencia (ICF)

Se confirmó la sobreexpresión de BCL-XL en las células infectadas mediante inmunocitofluorescencia (ICF), utilizando un anticuerpo específico frente a BCL-XL.

Las células fijadas se lavaron 3 veces con PBS (Biowest) y se permeabilizaron con una solución 3% v/v Triton X-100 (Merck) en PBS durante 5 minutos. Una vez lavado el detergente con PBS, se bloquearon los cubreobjetos con tampón de bloqueo (composición descrita en la Tabla 4 del Anexo 1) durante 1 hora en agitación a RT.

Se empleó un anticuerpo primario anti-BCL-XL monoclonal de conejo (Cell Signaling) en dilución 1:200 en tampón de bloqueo durante toda la noche en agitación leve. Al día siguiente, se lavó el anticuerpo primario con PBS y se incubaron los cubreobjetos con el anticuerpo secundario (policlonal de cabra anti-ratón Alexa Fluor 568, Invitrogen) a concentración 1:500 en tampón de bloqueo. Se mantuvo durante 1 hora en agitación a RT.

Finalmente, se lavó el anticuerpo secundario y se tiñeron los núcleos mediante incubación con 10 µg/mL de sonda Hoechst 33342 (Invitrogen) en 1 mL de BSA 3% durante 10 minutos en agitación a RT. Esta sonda fluorescente es capaz de intercalarse en el DNA, marcando los núcleos de color azul en el microscopio de fluorescencia.

A continuación, se lavaron los cubreobjetos con PBS y se observó la fluorescencia celular en un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse TE-2000-V) con una cámara acoplada (Nikon digital camera DMX 1200C), utilizando un led (*Cool led* PE-300 whiel) para excitar los fluoróforos.

La imagen obtenida se analizó utilizando el software libre Fiji (ImageJ). La longitud de onda de emisión del anticuerpo secundario se encuentra entre el color naranja y el amarillo en el espectro de luz visible, y el programa utilizado permite separar las capas correspondientes a los 3 colores base de la imagen: rojo, azul y verde, apareciendo la fluorescencia del anticuerpo secundario en la capa roja.

En las fotografías de células infectadas con adBcl-XL se ajustó el umbral mínimo de intensidad de la capa roja para que coincidiese con la intensidad de las células infectadas con adLuc. De este modo, se pudo comparar la intensidad de fluorescencia en las células que sobreexpresaban BCL-XL frente a la intensidad de fluorescencia correspondiente a su expresión endógena. A continuación, se analizó la intensidad de fluorescencia de cada fotografía como el número de píxeles de la capa roja normalizado

por el número de células, expresándose en intensidad/nº de células (u.a., unidades arbitrarias), obtenida mediante el conteo de núcleos de la capa azul (Figura 7).

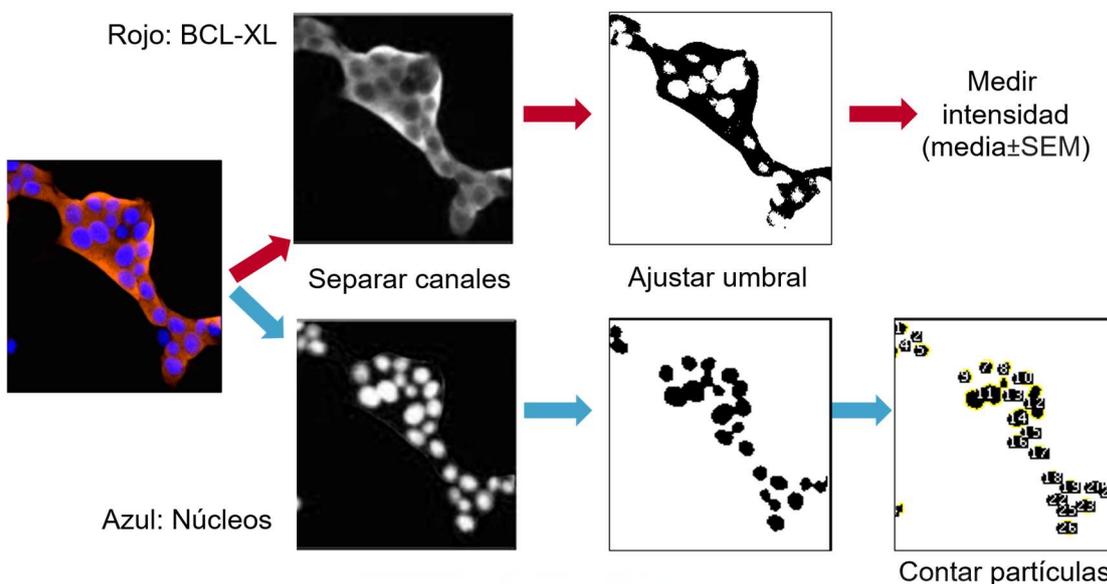


Figura 7. Esquema explicativo del modo de cuantificación de las imágenes ICF. En primer lugar, se separaron los canales (rojo, verde y azul). En el canal rojo, se ajustó el umbral de fluorescencia de las fotografías adBcl-XL para que coincidiese con el de las fotografías adLuc y a continuación se midió dicha intensidad de fluorescencia. En el canal azul, se contaron los núcleos. La intensidad de fluorescencia se expresó como unidades arbitrarias (u.a.) por número de células.

Registro de Ca^{2+} intracelular

Para evaluar el efecto de la sobreexpresión de BCL-XL en la función de la célula β pancreática, se analizaron las oscilaciones de Ca^{2+} intracelular frente a diferentes estímulos secretores. Estos experimentos se realizaron 48-72 horas después de la sobreexpresión de BCL-XL.

El registro de Ca^{2+} intracelular permite analizar en tiempo real las oscilaciones de concentración de Ca^{2+} citosólico que se producen en células β individuales en respuesta a estímulos fisiológicos y metabólicos. Estas oscilaciones son las responsables de la fusión de los gránulos de insulina a la membrana plasmática para su secreción, y su duración y frecuencia determinan la intensidad de la respuesta secretora (Barbosa et al., 1998).

Esta técnica requiere del uso de la sonda fluorescente ratiométrica Fura-2/AM (Invitrogen), cuya forma acetoximetil (AM) accede por difusión pasiva al interior celular. Una vez en el citoplasma, es digerida por esterasas intracelulares inespecíficas a su forma polar no difusible. El espectro de excitación de esta sonda difiere si se encuentra unida o no a Ca^{2+} , presentando un máximo de excitación a 340 nm en su forma unida y a 380 nm en su forma libre. Esto permite calcular la razón de fluorescencias F340/380, donde aumentos en este valor implican un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular.

La sonda Fura-2/AM se preparó previamente a una concentración de 2 ng/ μL en DMSO (Sigma). Para la incubación de las células, se diluyó a una concentración de 2 ng/mL en medio de perfusión (composición descrita en la Tabla 3 del Anexo 1), durante 30 minutos a temperatura ambiente (RT) en una cámara húmeda. Se añadió una concentración no estimuladora de glucosa al medio con la sonda, que para INS-1E fue de 3 mM y para EndoC- βH1 fue de 0 mM glucosa.

Los estímulos secretores se prepararon diluyendo la cantidad apropiada de glucosa y KCl para establecer las siguientes condiciones:

- Concentración no estimuladora de glucosa (0 o 3 mM glucosa).
- Concentración estimuladora de glucosa (20 mM glucosa).
- 20 mM glucosa más 30 mM KCl.

Se observó la razón de fluorescencias en respuesta a cada estímulo utilizando un microscopio de fluorescencia (Zeiss Axiovert 200) acoplado a un policromador (TILL Photonics) y a un ordenador con el software Aquacosmos 2.6 para el análisis de los registros. Todos los registros se realizaron dentro de un rango de temperaturas estable de 33-37°C.

Tras cada registro, las células se fijaron con una solución acuosa de 4% v/v paraformaldehído (VWR prolabo chemicals) durante 10 minutos para su posterior uso en ICF.

La respuesta de Ca^{2+} se evaluó como el área bajo (AUC) la curva de las oscilaciones de Ca^{2+} intracelular. Para ello, se estableció una línea basal en el valor de fluorescencia (F340/F380) inicial de cada registro y se calculó el AUC total utilizando el software estadístico GraphPad Prism 7.0. El valor obtenido se expresó en unidades arbitrarias (u.a.) de área.

Secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS)

Para comprobar el efecto de la sobreexpresión de BCL-XL en la función de la célula β , se realizaron experimentos de secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS) y por otros estímulos secretores. Estos experimentos se realizaron 48 horas después de la infección del cultivo, en placas de 96 pocillos (p96, para EndoC- β H1) o de 24 pocillos (p24, para INS-1E) en células no tratadas (Figura 6).

Los estímulos secretores se prepararon diluyendo la cantidad apropiada de glucosa (G), KCl y forskolina (F) en medio Krebs (composición descrita en la Tabla 5 del Anexo 1) para establecer las siguientes condiciones: concentración no estimuladora de glucosa, concentración estimuladora de glucosa y concentración estimuladora de glucosa más un estímulo pensado para forzar la secreción máxima de insulina. Las concentraciones no estimuladoras de glucosa dependieron de cada línea celular, siendo de 1.7 mM glucosa para INS-1E y de 0 mM glucosa para EndoC- β H1. La concentración estimuladora de glucosa fue de 17 mM para INS-1E y de 20 mM para EndoC- β H1. Los estímulos para la secreción máxima utilizados fueron 10 μ M forskolina para INS-1E y 10 μ M forskolina o 30 mM KCl para EndoC- β H1.

En el caso de EndoC- β H1, se empleó el medio Krebs comercial β KREBS (Univercell-Biosolutions) suplementado con 0.1% w/v BSA. Todos los medios se prepararon a un pH 7.4 equilibrado con CO₂ (g) y esterilizado por filtración en un filtro con tamaño de poro 0.2 μ m.

Se comparó la respuesta de las células infectadas con adBcl-XL y las infectadas con adLuc (Figura 8) en diferentes incubaciones secuenciales realizadas a 37 °C:

- Preincubación. El contenido de cada pocillo se sustituyó por 200 μ L (p96) o 500 μ L (p24) de medio Krebs con concentración no estimuladora de glucosa durante 1 h.
- Secreción. Se sustituyó el medio de lavado por 200 μ L (p96) o 500 μ L (p24) de medio Krebs con los estímulos secretores, de manera secuencial: glucosa no estimuladora, glucosa estimuladora y glucosa estimuladora más estímulo de secreción máxima.

Las células se incubaron durante 1 hora con cada estímulo secretor, tras lo cual se retiraron 100 μ L (p96) o 400 μ L (p24) del sobrenadante de cada pocillo para su análisis mediante inmunoensayo ELISA antes de cambiarlo por el estímulo siguiente.

- Rascado. Finalizada la secreción, se eliminó completamente el medio de cada pocillo, se añadió Tampón de Lisis (composición descrita en la Tabla 6 del Anexo 1) y se recogieron las células del fondo para el análisis del contenido de insulina.

Las muestras de secreción y de contenido de insulina se centrifugaron 5 minutos a 700 rpm, a 4°C para eliminar restos celulares y se congelaron los sobrenadantes a -20°C.

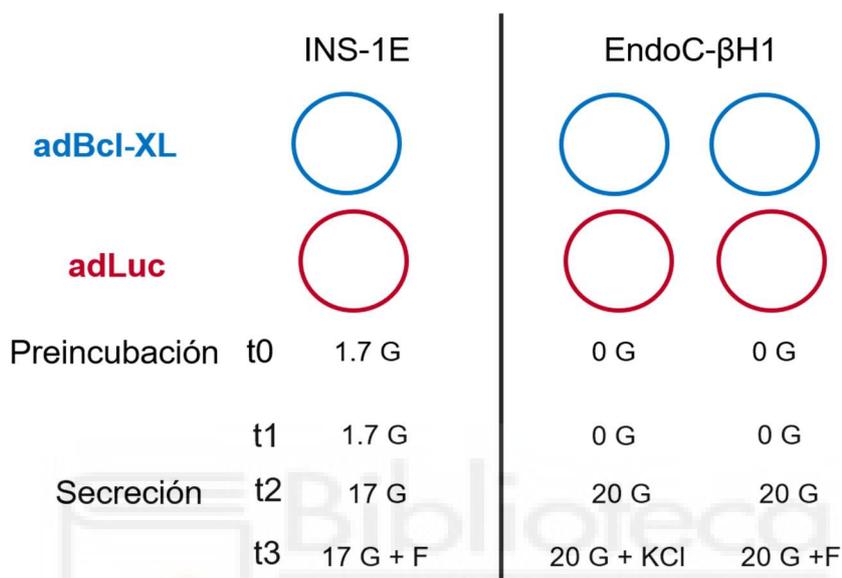


Figura 8. Esquema explicativo de las incubaciones secuenciales realizadas en los experimentos de GSIS, en células INS-1E y EndoC-βH1 infectadas con adBcl-XL o con adLuc. Consta de una preincubación (t0) con medio Krebs con concentración no estimuladora de glucosa y tres incubaciones secuenciales (t1, t2, t3): t1 concentración no estimuladora de glucosa (1.7 G para INS-1E, 0 G para EndoC- βH1), t2 concentración estimuladora de glucosa (17 G para INS-1E, 20 G para EndoC- βH1) y t3 concentración estimuladora de glucosa más estímulo de secreción máxima (17 G + F para INS-1E, 20 G + KCl ó 20 G + F para EndoC- βH1). En la figura: G representa glucosa (mM), KCl representa 30 mM de KCl y F representa 10 μM de forskolina.

Tratamientos

Una vez caracterizados los modelos celulares de sobreexpresión de BCL-XL en célula β pancreática, el siguiente objetivo fue comprobar si la mayor expresión de BCL-XL juega un papel en la protección de la célula β frente a estímulos proapoptóticos presentes en el desarrollo de la diabetes tipo 1 y tipo 2.

Para ello, 48 horas después de la infección (Figura 6), las células destinadas al ensayo de viabilidad se incubaron con tratamientos que simularan el estrés inducido por

citoquinas durante la insulinitis en diabetes tipo 1 y un estímulo de estrés metabólico característico de la diabetes tipo 2 (Figura 9).

Para el cóctel de citoquinas, se utilizó la combinación sinérgica de IL-1 β recombinante humana (R&D Systems, 201-LB/CF) e IFN- γ . Se utilizó IFN- γ de rata (R&D Systems, 585-IF) para INS-1E y humano (Peprotech, 300-02-250UG) para EndoC- β H1.

Las citoquinas se prepararon según indicaciones del fabricante y se diluyeron en medio completo. Las concentraciones utilizadas fueron: 100 U/mL de IFN- γ y 10 U/mL de IL-1 β para INS-1E, y 1000 U/mL de IFN- γ y 50 U/mL de IL-1 β para EndoC- β H1.

Para el estímulo característico de la diabetes tipo 2, se reprodujo el efecto lipotóxico en la célula β de una concentración fisiopatológica de 0.5 mM palmitato (Sigma) (Cunha et al., 2008).

El medio utilizado como vehículo del palmitato consistió en medio completo de cada línea celular con las siguientes modificaciones: 1% v/v FBS, 0.67% w/v BSA (Sigma) y 0.17% v/v etanol (Panreac).

Se establecieron 2 condiciones:

- Células tratadas con el vehículo del palmitato. Se sustituyó el medio de cada pocillo por vehículo del palmitato.
- Células tratadas con 0.5 mM palmitato. Se sustituyó el medio del pocillo por vehículo de palmitato con 0.5 mM palmitato.

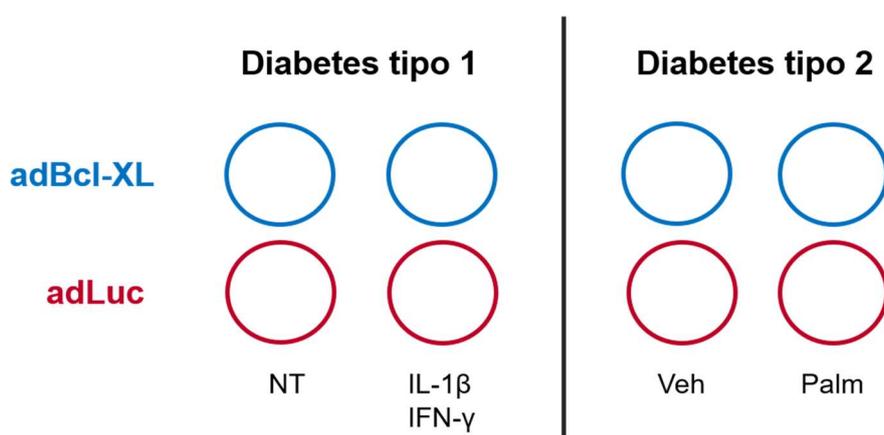


Figura 9. Esquema representativo de los tratamientos realizados para simular las condiciones proapoptóticas típicas de la diabetes tipo 1 y tipo 2. Se utilizaron células INS-1E y EndoC- β H1 infectadas con adBcl-XL frente a infectadas con adLuc. Para representar los estímulos de la diabetes tipo 1 se utilizó la combinación de: 100 U/mL de IFN- γ más 10 U/mL de IL-1 β (para INS-1E) o 1000 U/mL de IFN- γ más 50 U/mL de IL-1 β (para EndoC- β H1), y se enfrentaron a pocillos no tratados (NT). Para el estímulo

característico de la diabetes tipo 2, se trató con vehículo del palmitato (Veh) o con medio de palmitato más 0.5 mM palmitato (Palm).

Evaluación de la viabilidad celular

Tras 48 horas de tratamiento, las células se incubaron con dos agentes intercalantes del DNA: la sonda fluorescente Hoechst 33342 y yoduro de propidio, PI (Sigma) (tinción HO/PI) durante 15 minutos a 37°C en medio de cultivo de cada línea celular. Estos fluoróforos tienen longitudes de onda de excitación/emisión diferentes y alejadas entre sí: 380/535 nm para Hoechst 33342 y 555/645 nm para PI (Lema, Varela-Ramirez, and Aguilera, 2011).

Ambos reactivos se prepararon previamente a una concentración de 1 mg/mL en PBS y se filtraron con un filtro de tamaño de poro 0.2 μ m (Filtropur S 0.2, SARSTEDT). Para la tinción en INS-1E se utilizó una concentración final de 5 μ g/mL y para la tinción de EndoC- β H1 se utilizó una concentración final de 10 μ g/mL de ambos reactivos.

Tras la incubación, se sustituyó la mitad del volumen de cada pocillo por medio completo de cada línea. A continuación, se observó la fluorescencia celular utilizando un microscopio de fluorescencia (Zeiss Axiovert 200) acoplado a una lámpara de mercurio (Zeiss Fluo-Arc).

El porcentaje de viabilidad celular se evaluó mediante el conteo de células viables frente a apoptóticas, en base a su diferente permeabilidad a los agentes intercalantes Hoechst 33342 y PI. Las células viables y apoptóticas tempranas conservan la integridad de su membrana plasmática, por lo que sólo la sonda Hoechst 33342 entra al núcleo y lo tiñe de color azul.

En las etapas iniciales de la apoptosis, la cromatina se condensa y compacta, siendo posible reconocerlas mediante esta técnica por un color azul más intenso de sus núcleos. Las células apoptóticas tardías tienen la membrana comprometida, por lo que son incapaces de mantener el PI fuera del citoplasma, y éste tiñe los núcleos de color rojo (Figura 10).

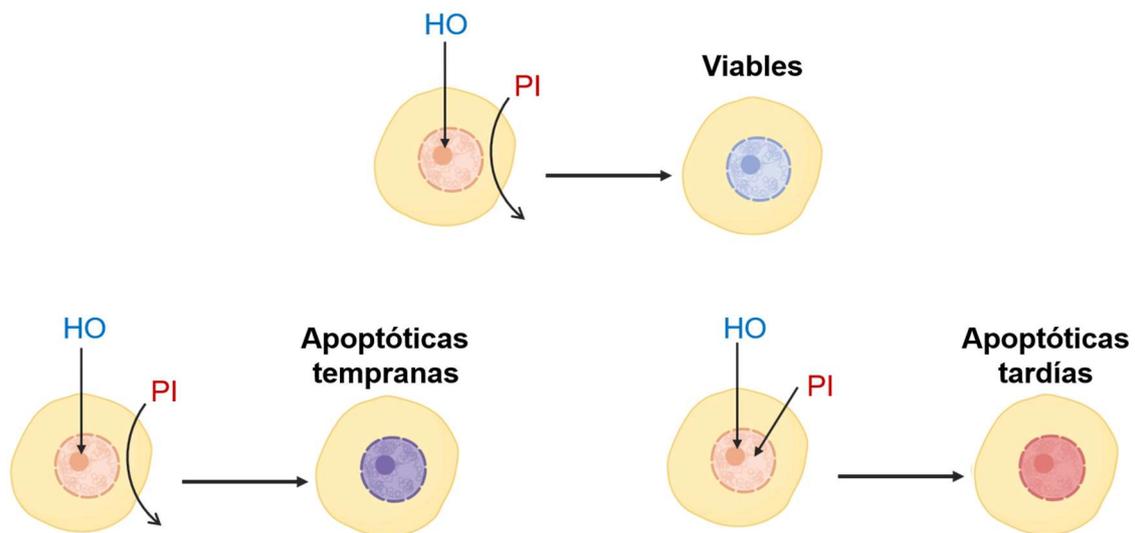


Figura 10. Esquema explicativo del funcionamiento de la tinción HO/PI. Las células viables expulsan el PI, mientras que el Hoechst 3342 tiñe el núcleo de color azul. El núcleo condensado de las células apoptóticas tempranas se distingue por un tono de azul más intenso. Las células apoptóticas tardías pierden la impermeabilidad al PI y éste tiñe los núcleos de color rojo.

Por sus características inherentes, esta técnica requirió del doble conteo de los pocillos por parte de dos investigadores diferentes, siendo uno de ellos un investigador imparcial, es decir, desconocedor del contenido o tratamiento de los pocillos. Se contaron al menos 500 células de cada pocillo.

ELISA

Se analizó cuantitativamente el resultado del ensayo de secreción de insulina mediante un kit ELISA frente a insulina de rata (MercoDIA) o frente a insulina humana (MercoDIA). El funcionamiento de ambos kits es el mismo, basado en la acción conjunta de dos anticuerpos monoclonales anti-insulina. Se realizaron los inmunoensayos siguiendo las indicaciones del fabricante.

La dilución utilizada para este ensayo fue de 1:10 (v/v) para las muestras de secreción y 1:1000 (v/v) para las muestras de lisado celular (contenido). La representación del resultado de este ensayo fue diferente para cada línea celular.

Para la línea celular INS-1E, se evaluó la cantidad total de proteína de los pocillos tras el raspado mediante ensayo Bradford. El resultado del ELISA se representó como ng de insulina secretada por mg de proteína total, y ng de contenido de insulina total

(secretada más el contenido celular en el lisado recogido al final del experimento) por mg de proteína total.

Para la línea celular EndoC- β H1, se recomienda la representación del contenido celular en ng por millón de células; la secreción se representó como ng de insulina por hora.

Ensayo Bradford

Se empleó para la cuantificación de proteína total en el lisado de los pocillos de INS-1E del ensayo de secreción de insulina (GSIS). Se empleó un colorante hidrofóbico, el Reactivo de Bradford (Sigma) o Bradford Comassie azul brillante G-250, que en disolución acuosa de ácido fosfórico tiene un color pardo-marrón. Su interacción inespecífica con el entorno hidrofóbico de las proteínas desplaza su espectro de absorbancia, medible a 595 nm.

Las muestras de lisado celular se prepararon en una placa de 96 pocillos a una concentración 1:10 (v/v) en 10 μ L de agua destilada, a la que se añadieron 200 μ L de reactivo Bradford y se midió su absorbancia en un lector de placas a 595 nm. La concentración de proteína total se determinó empleando una recta patrón de BSA de concentraciones 0-0.5 mg/mL.

Western Blot

Se comprobó el nivel de expresión de BCL-XL en las células infectadas con adBcl-XL frente a las infectadas con adLuc en ambos tipos celulares, utilizando la técnica analítica Western Blot. Esta técnica permite identificar una proteína específica partir de una mezcla compleja como el lisado celular. La expresión de BCL-XL (30 kDa) se comparó con la de tubulina (55 kDa), una proteína de expresión constitutiva en el modelo de estudio.

Se obtuvieron lisados celulares de los experimentos anteriores, utilizando el Tampón de Lisis descrito en la Tabla 6 del Anexo 1, y se congelaron a -20°C . Para preparar las muestras para la electroforesis, se descongelaron 40 μ L de lisado celular en hielo junto con 10 μ L de tampón de carga 5X (composición descrita en la Tabla 7 del Anexo 1) y se desnaturalizaron las proteínas en un termobloque (Labnet Accutherm) a 99°C durante 7 minutos.

A continuación, se realizó una electroforesis en gel comercial de poliacrilamida (Criterion TGX, Biorad) con gradiente de concentración de acrilamida de 4-12%. La electroforesis se realizó aplicando una corriente de 110 mV durante 1.5 horas con el gel embebido en tampón de electroforesis TGS (diluido con agua destilada a partir de tampón 10x TGS, Biorad). Finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron del gel a una membrana de nitrocelulosa (Biorad) mediante un sistema de transferencia semiseca a 25V durante 7 minutos (Trans Blot Turbo, Biorad).

La membrana se bloqueó con una solución de 5% w/v de leche en polvo desnatada (Hacendado, Mercadona) en medio TBS-T (composición descrita en la Tabla 8 del Anexo 1), durante 1 hora en agitación a RT. Seguidamente, se lavó con TBS-T y se incubó durante toda la noche en agitación a 4°C, en una solución de 5% w/v BSA en TBS-T con los siguientes anticuerpos primarios: anti-BCL-XL monoclonal de conejo (Cell Signaling) en dilución 1:1000 y anti-tubulina monoclonal de ratón (Santa Cruz Biotechnology) en dilución 1:1000.

Tras lavar la membrana con TBS-T, se incubó en una solución 1:5000 de anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa de rábano (HRP), en solución 5% de leche w/v en TBS-T durante 1 hora en agitación a RT. Se utilizaron anticuerpos policlonales de cabra anti-conejo para BCL-XL, o anti-ratón para tubulina (Biorad).

La detección específica de cada banda se realizó mediante la adición de sustrato quimioluminiscente (SuperSignal West Femto) de la HRP, cuya señal se detectó en un transiluminador (Chemi Doc MP, Biorad). Las imágenes tomadas por el transiluminador se editaron para su visualización con el software *Image Lab*.

Análisis estadístico

Los resultados presentados en este trabajo se muestran como media \pm SEM en gráficos de barras, indicando con círculos sobre cada barra los valores de cada experimento. Los resultados de todos los experimentos fueron analizados y representados utilizando el software GraphPad Prism 7.0. Las comparaciones entre grupos se analizaron con test paramétricos cuando los datos se ajustaban a una distribución normal y mediante test no paramétricos cuando no se ajustaban a la misma. Los test paramétricos utilizados fueron t-test para comparación entre dos grupos y *one-way* ANOVA para comparación entre más grupos. Se consideró un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

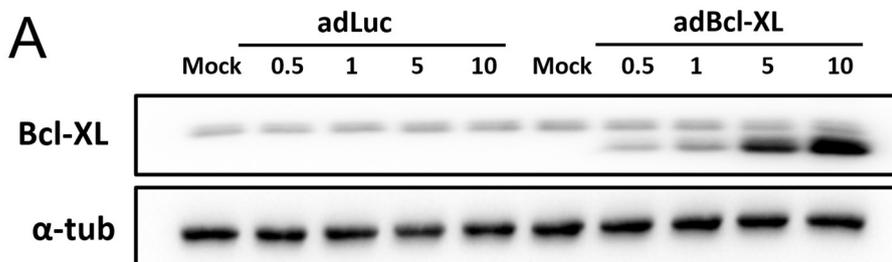
Resultados

Sobreexpresión de BCL-XL

Se sabe que los vectores adenovirales pueden tener un efecto dosis-dependiente negativo en la viabilidad celular, independientemente del gen que se sobreexpresa (Weber et al., 1997). Por tanto, pensamos que era necesario establecer una concentración viral que permita la sobreexpresión efectiva de la proteína sin afectar a la viabilidad celular. Para ello, se determinó la concentración viral o M.O.I. óptima para la sobreexpresión de BCL-XL en INS-1E, evaluando el efecto en la expresión de BCL-XL y en la viabilidad celular de los M.O.I. 0.5, 1, 5 y 10 de adLuc y adBcl-XL (Figura 11). Se empleó como control negativo (*Mock*) células sometidas al mismo procedimiento que las células infectadas, pero sin incluir el adenovirus.

Analizamos la sobreexpresión mediante Western Blot, observándose una mayor expresión de BCL-XL en todos los M.O.I. de adBcl-XL utilizados, que alcanzó su máximo en los M.O.I. 5 y 10. No se produjeron cambios en la expresión de BCL-XL endógeno (adLuc). El porcentaje de apoptosis se evaluó 48 horas después de la infección mediante la tinción HO/PI. En las células infectadas con los M.O.I. 0.5, 1 y 5 de cada vector adenoviral el porcentaje de apoptosis fue el mismo que el de las células no infectadas (*Mock*), estando dentro de los valores normales de apoptosis basal para la línea celular INS-1E, en torno al 2-3 % (Santin et al., 2011).

El uso de un M.O.I. 10 aumentó el porcentaje de apoptosis hasta el 4.6 ± 0.2 (adLuc), por lo que se escogió el M.O.I. 5 como el más adecuado para la sobreexpresión de BCL-XL.



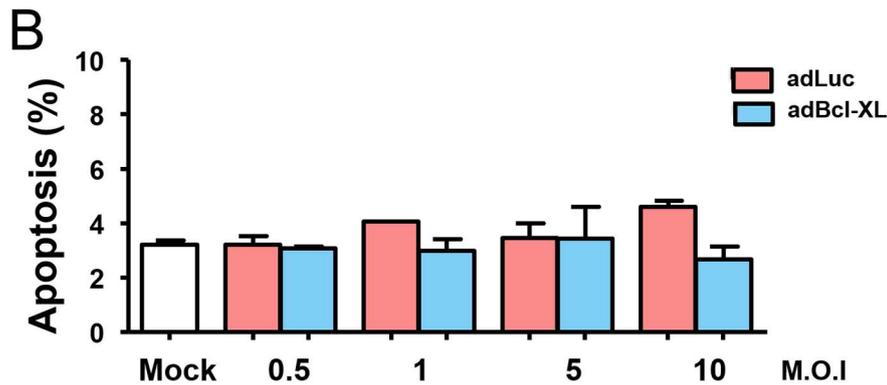


Figura 11. Optimización de la concentración viral (M.O.I.) para la sobreexpresión de BCL-XL en INS-1E. **(A)** Expresión de BCL-XL tras las infecciones con M.O.I. 0 (*Mock*), 0.5, 1, 5 y 10 de adLuc y adBcl-XL. Figura representativa de un análisis Western Blot de BCL-XL y α -tubulina. **(B)** Análisis la viabilidad celular tras la infección con M.O.I. 0 (*Mock*), 0.5, 1, 5 y 10 con adLuc y adBcl-XL. El porcentaje de apoptosis se determinó mediante conteo tras teñir el cultivo con HO/PI. Las barras muestran media \pm SEM de dos experimentos independientes.

Se empleó ICF para evaluar el nivel de expresión de BCL-XL en células de INS-1E y EndoC- β H1 infectadas con un M.O.I. 5 de cada vector (Figura 12). Las células se tiñeron con el agente intercalante Hoechst 33342 para marcar los núcleos (azul) y mediante anticuerpos específicos frente a BCL-XL (rojo). Se aisló el color rojo en las fotografías y se comparó la intensidad de fluorescencia entre las células infectadas con adLuc y con adBcl-XL.

Se analizó la intensidad de fluorescencia de cada fotografía como el número de píxeles de la capa roja normalizado por el número de células, encontrándose un aumento de la expresión de BCL-XL de 7 veces sobre su expresión endógena en INS-1E (2.71 ± 0.42 u.a) y 4.9 veces frente a la expresión endógena de EndoC- β H1 (4.17 ± 0.54 u.a).

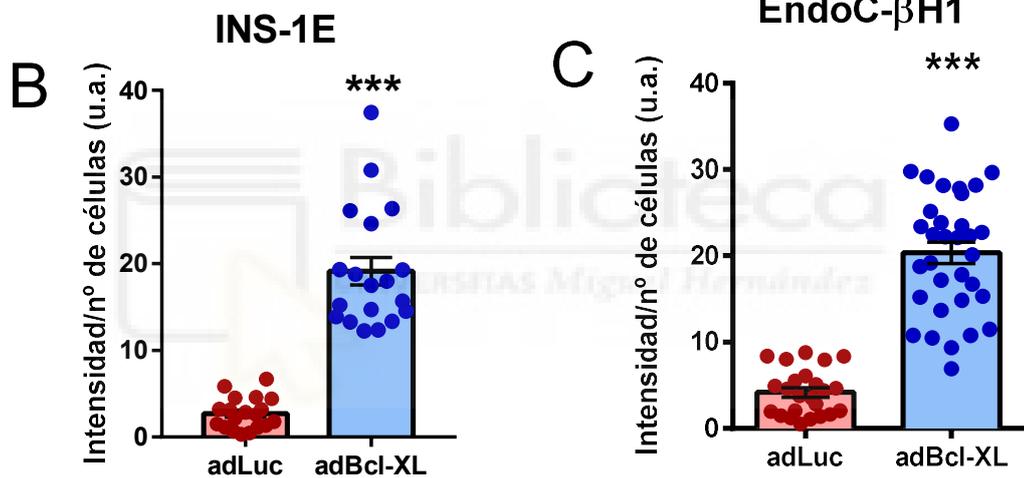
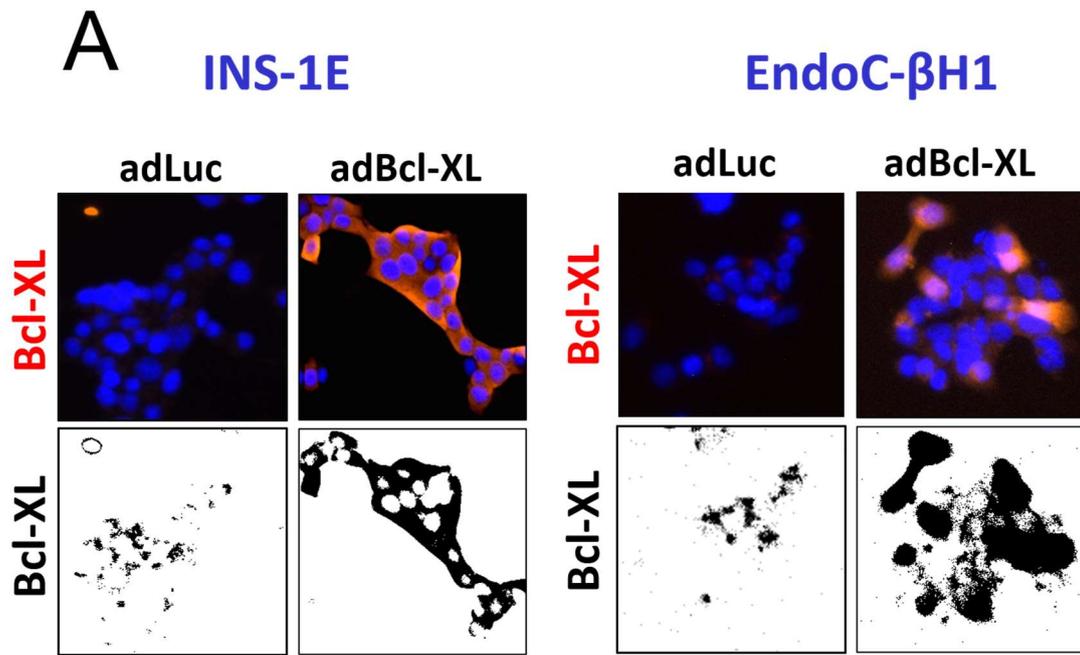


Figura 12. Inmunocitofluorescencia de células de INS-1E y EndoC-βH1, infectadas con un M.O.I 5 de adLuc y de adBcl-XL. **(A)** Fotografías de fluorescencia de las células. En los paneles superiores se muestran los núcleos teñidos de azul por la sonda Hoechst 33324 y BCL-XL marcado en rojo en los citoplasmas. En los paneles inferiores se observa el resultado de sustraer las capas verde y azul de los paneles superiores: en negro, intensidad de la capa roja y en blanco, ausencia de intensidad. Fotografías tomadas a 20x. **(B)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de BCL-XL en células INS-1E infectadas con adLuc y adBcl-XL. Las barras muestran media \pm SEM de 19 imágenes de células adLuc y 19 imágenes de células adBcl-XL. **(C)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de BCL-XL en células EndoC-βH1 infectadas con adLuc y adBcl-XL. Las barras muestran media \pm SEM de 24 imágenes adLuc y 33 imágenes adBcl-XL. Los gráficos muestran resultados de 8 experimentos independientes, realizados en 3 días diferentes (INS-1E) y 8 experimentos independientes, realizados en 4 días diferentes (EndoC-βH1). *** $p < 0.001$ comparación con adLuc; t test de Mann-Whitney.

Evaluación de la función celular

Con el fin de analizar el efecto en la función celular de la sobreexpresión de BCL-XL se analizó la capacidad secretora de insulina y la respuesta del Ca^{2+} intracelular frente a diferentes estímulos secretores.

Respuesta de Ca^{2+} intracelular

Utilizamos dos tipos de estímulos, uno es un estímulo metabólico que despolariza la membrana, una concentración estimuladora de glucosa, y el otro, es un estímulo que únicamente despolariza la membrana sin afectar el metabolismo, una concentración 30 mM de KCl extracelular.

La entrada y el metabolismo de una cantidad suficiente de glucosa, en nuestro caso 20 mM de glucosa, incrementa la relación de concentraciones $[\text{ATP}]/[\text{ADP}]$ en el citosol y bloquea los canales K_{ATP} , responsables del mantenimiento del potencial de reposo en la célula β pancreática. Su cierre despolariza la membrana plasmática, abriendo canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y produciendo potenciales de acción. Esto causa la entrada de Ca^{2+} al citosol de una forma oscilatoria, como consecuencia de la actividad eléctrica oscilatoria de potenciales de acción. Dichas oscilaciones de la concentración citoplasmática de Ca^{2+} inducen la secreción de los gránulos de insulina.

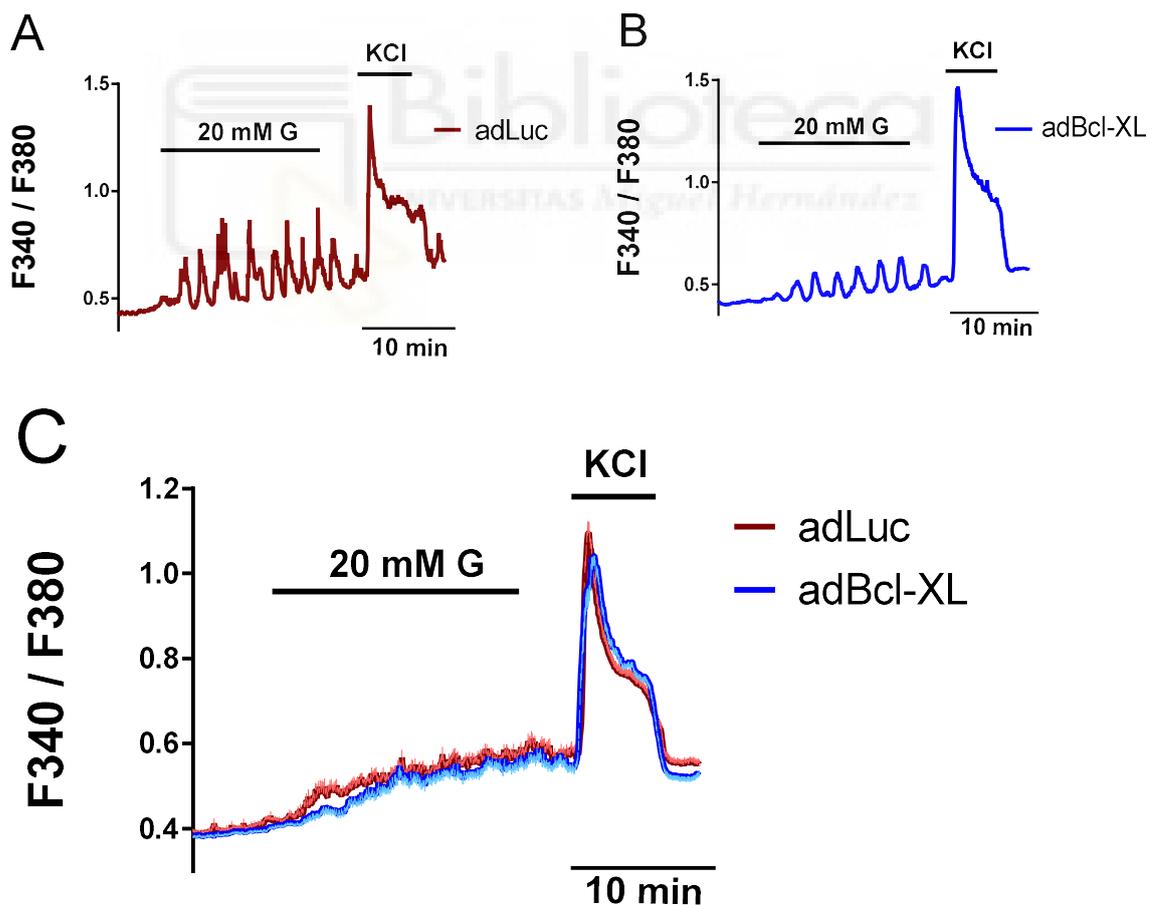
La concentración utilizada de KCl induce la despolarización de la membrana plasmática de la célula β al alterar el gradiente de K^+ , dicha despolarización abre los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje produciendo potenciales de acción y aumentando el Ca^{2+} citosólico. En este caso no se producen oscilaciones.

Para registrar la señal de Ca^{2+} intracelular empleamos la sonda fluorescente que une Ca^{2+} , FURA-2/ en su forma acetoximetilada (AM), y el resultado se representa como la media \pm SEM (error estándar de la media) de los registros de adLuc frente a adBcl-XL.

Evaluamos el efecto de la sobreexpresión de BCL-XL en INS-1E en 47 células infectadas con adLuc y en 47 infectadas con adBcl-XL (Figura 13). En todos los registros perfundimos una solución que contenía una concentración 3 mM de glucosa durante 5 minutos, y a continuación, perfundimos una concentración estimuladora de 20 mM de glucosa durante 15 minutos. Para finalizar volvimos a la concentración de glucosa 3 mM durante 3 minutos y, finalmente, añadimos 30 mM KCl durante 5 minutos.

Con el fin de cuantificar la cantidad de Ca^{2+} que entra en la célula, calculamos el AUC, tomando como línea basal el primer valor de fluorescencia de cada registro.

Ambos grupos celulares presentaron oscilaciones normales de Ca^{2+} intracelular, características de la respuesta a glucosa en la célula β pancreática. Sin embargo, se encontró una disminución del 5 % en el AUC medio de las células que sobreexpresaban BCL-XL respecto al control (859.10 ± 10.47 u.a.), lo que supuso una diferencia significativa en la respuesta de Ca^{2+} intracelular. Cabe destacar que esta diferencia no se encontró al analizar la respuesta de Ca^{2+} intracelular a KCl, mostrando ambos grupos celulares la misma amplitud del pico frente a este estímulo secretor (panel C de la Figura 13, amplitud del pico en respuesta a KCl no mostrado), ni en la concentración basal de Ca^{2+} intracelular, mostrada en el panel E de la Figura 13 como la razón de fluorescencias F340/F380. La respuesta de Ca^{2+} intracelular de la línea INS-1E fue heterogénea, lo cual era esperable al ser una característica inherente de la célula β pancreática (Camunas-Soler et al., 2019; Farack et al., 2019).



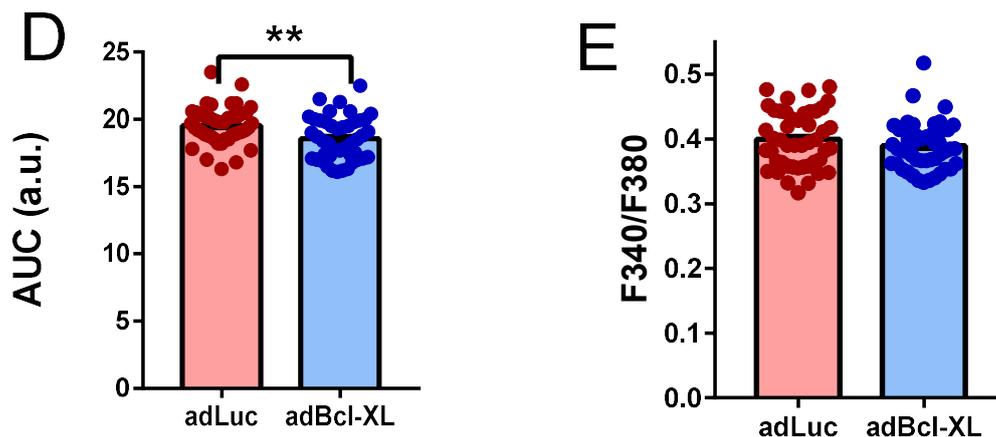


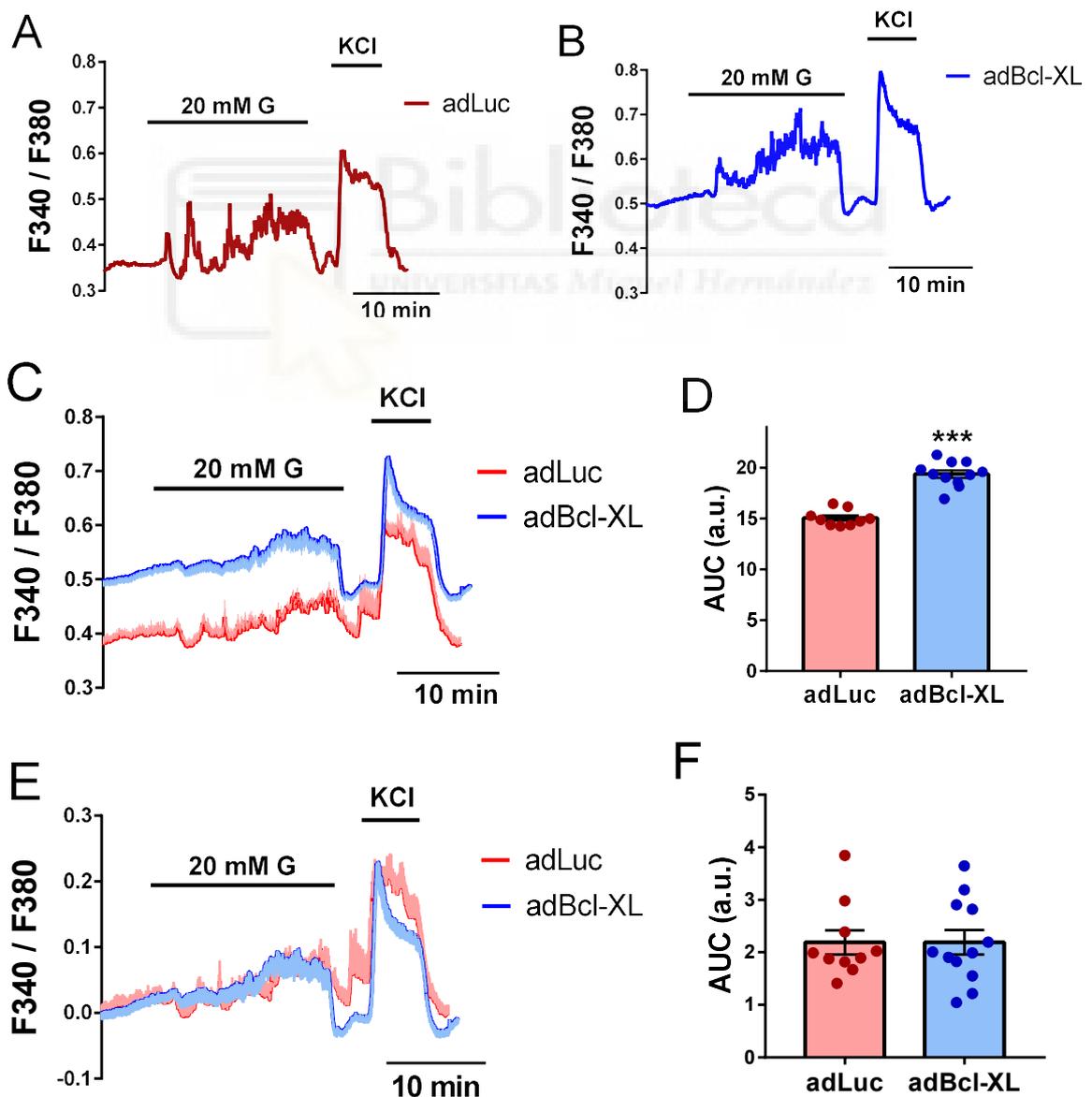
Figura 13. Efecto de la sobreexpresión de BCL-XL en la respuesta de Ca^{2+} intracelular a glucosa y KCl en INS-1E. **(A)** Registro representativo de oscilaciones de Ca^{2+} intracelular en respuesta a 20 mM de glucosa y 30 mM de KCl en células infectadas con adLuc. **(B)** Registro representativo de oscilaciones de Ca^{2+} intracelular en respuesta a 20 mM de glucosa y 30 mM de KCl en células infectadas con adBcl-XL. **(C)** Solapamiento de los registros de oscilaciones de Ca^{2+} intracelular en células infectadas con adLuc (rojo) y adBcl-XL (azul). Muestra la media (línea oscura continua) + SEM (sombreado claro) del ratio de fluorescencia F340/F380 de 47 células infectadas con adLuc y 47 células infectadas con adBcl-XL. **(D)** Área bajo la curva (AUC) de los registros de Ca^{2+} intracelular de células infectadas con adLuc o adBcl-XL. **(E)** Razón de fluorescencias F340/F380 de los 5 minutos iniciales de cada registro de Ca^{2+} intracelular. **(D y E)** Las barras muestran media \pm SEM de 47 células infectadas con adLuc y 47 células infectadas con adBcl-XL; ** $p < 0.01$ en la comparación del AUC entre adLuc y adBcl-XL, test de Mann-Whitney. Datos de células individuales procedentes de 6 registros independientes realizados en 3 días diferentes (adLuc) y 4 registros independientes realizados en 2 días diferentes (adBcl-XL).

El efecto de la sobreexpresión de BCL-XL en las oscilaciones intracelulares de Ca^{2+} de EndoC- β H1 se evaluó en 10 células infectadas con adLuc y 12 infectadas con adBcl-XL (Figura 14). El protocolo de estimulación fue el mismo que el utilizado en las INS-1E descrito anteriormente, pero empleando 0 mM de glucosa en lugar de 3 mM. Al igual que las células INS-1E, el comportamiento oscilatorio de la concentración de Ca^{2+} intracelular en las células EndoC- β H1 fue el esperado.

El cálculo del AUC para las células β humanas se realizó siguiendo el mismo procedimiento que para las células INS-1E. Se encontró un incremento significativo del 16.4 % en el AUC de las células con sobreexpresión de BCL-XL frente al control (15.1 ± 0.3 u.a.) (panel D de la Figura 14). Como se puede apreciar en los paneles C, E y G de la misma figura, esta diferencia se debió a una razón basal de fluorescencia en las células adBcl-XL 22.3 % mayor que en las células control, y no a una respuesta de Ca^{2+} intracelular diferente.

Los registros en el panel E están normalizados de modo que el primer valor de cada registro parta de un valor igual a 0 para la relación de fluorescencias F340/F380. El análisis del AUC bajo estas condiciones (panel F de la Figura 14) no muestra diferencias significativas. La amplitud del pico en respuesta a KCl no mostró diferencias significativas, independientemente de la normalización del registro (datos no mostrados).

La heterogeneidad en la respuesta de Ca^{2+} intracelular de la célula β pancreática hace imprescindible que los registros de Ca^{2+} intracelular se realicen en un número suficiente de células para el análisis adecuado de los resultados. Por tanto, es necesario realizar más registros de Ca^{2+} en esta línea celular para confirmar o rechazar los resultados obtenidos.



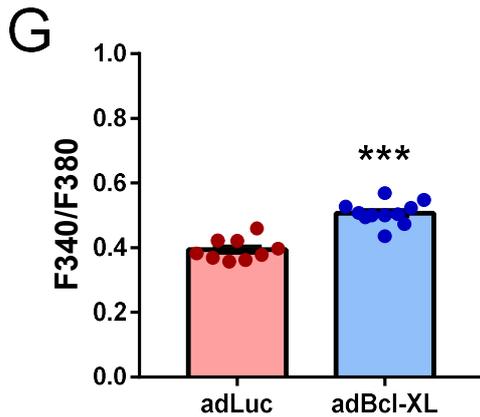


Figura 14. Efecto de la sobreexpresión de la proteína BCL-XL en la respuesta de Ca^{2+} intracelular frente a glucosa y KCl en EndoC- β H1. **(A)** Registro representativo de oscilaciones de Ca^{2+} intracelular en respuesta a 20 mM de glucosa y 30 mM de KCl en células infectadas con adLuc. **(B)** Registro representativo de oscilaciones de Ca^{2+} intracelular en respuesta a 20 mM de glucosa y 30 mM de KCl en células infectadas con adBcl-XL. **(C)** Solapamiento de los registros de oscilaciones de Ca^{2+} intracelular en células infectadas con adLuc (rojo) y adBcl-XL (azul) sin normalizar. **(D)** Área bajo la curva (AUC) de los registros de Ca^{2+} intracelular representados en el panel C. **(E)** Solapamiento normalizado de los registros de oscilaciones de Ca^{2+} intracelular en células infectadas con adLuc (rojo) y adBcl-XL (azul). **(F)** Área bajo la curva (AUC) de los registros de Ca^{2+} intracelular representados en el panel C. **(G)** Razón de fluorescencias F340/F380 de los 5 minutos iniciales de cada registro de Ca^{2+} intracelular. **(C y E)** Muestran la media (línea oscura continua) + SEM (sombreado claro) de la razón de fluorescencias F340/F380 de 10 células infectadas con adLuc frente a 12 células infectadas con adBcl-XL. **(D, F y G)** Las barras muestran media \pm SEM de 10 células infectadas con adLuc y 12 células infectadas con adBcl-XL. Datos de células individuales procedentes de 3 registros independientes realizados en 2 días diferentes. *** $p < 0.0001$ en la comparación adBcl-XL frente a adLuc; t-test.

Secreción de insulina estimulada por glucosa

Para realizar los experimentos de secreción de insulina empleamos una concentración estimuladora de glucosa (20mM), un estímulo despolarizante (30 mM de KCl), y un estímulo de secreción máxima (10 μ M de forskolina), que permitiese evaluar la respuesta celular frente a un alto requerimiento secretor. Los estímulos despolarizante y de secreción máxima se aplicaron en combinación con la concentración estimuladora de glucosa.

La forskolina es una droga que activa la enzima adenilato ciclasa y, por tanto, aumenta los niveles de AMPc, que potencian la secreción de insulina estimulada por glucosa, de una manera tanto dependiente como independientes de la enzima PKA (Seino and Shibasaki, 2005).

Las células control presentaron un incremento significativo de 3.7 veces su secreción de insulina al pasar a una concentración estimuladora de glucosa (de 95.84 ± 12.64 ng de insulina/hora). La combinación con forskolina aumentó 13.93 veces la secreción de insulina (365.35 ± 52.40 ng insulina/hora) frente a la secreción basal. La sobreexpresión de BCL-XL produjo una disminución significativa de la secreción de insulina en INS-1E frente a 17 mM de glucosa y de 17 mM de glucosa más 10 μ M forskolina, reduciéndose un 20.5 % y un 30.7 %, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas en el contenido de insulina de las células con sobreexpresión de BCL-XL frente a los valores control (8.23 ± 0.61 ng insulina/ μ g proteína total).

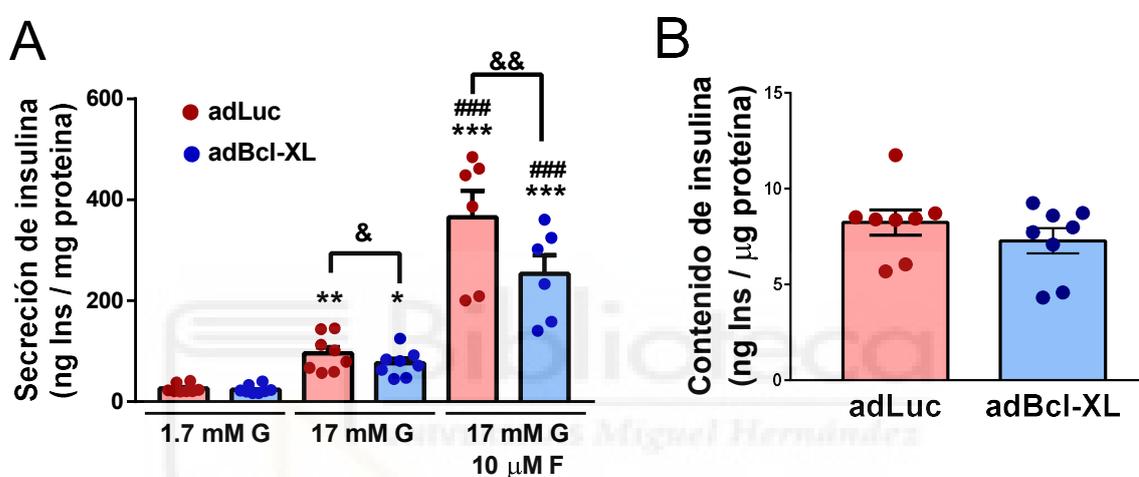


Figura 15. Efecto de la sobreexpresión de BCL-XL en la secreción de insulina estimulada por glucosa y KCl en INS-1E. **(A)** Secreción de insulina en células infectadas con adLuc (rojo) o adBcl-XL (azul) en diferentes condiciones secuenciales: 1.7 mM glucosa, 17 mM glucosa, y 17 mM glucosa más 10 μ M forskolina. **(B)** Contenido de insulina (ng) por μ g de proteína total. Las barras muestran media \pm SEM de 8 experimentos independientes para la secreción de glucosa, 6 de los cuales incluyeron la secreción frente a 17 mM glucosa más 10 μ M forskolina. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ comparación de la secreción de insulina en cada grupo (adLuc o adBcl-XL) con su secreción de insulina a 1.7 mM de glucosa; ### $p < 0.001$ comparación de la secreción de insulina de cada grupo con su secreción a 17 mM de glucosa (sin adición de forskolina); & $p < 0.05$, && $p < 0.01$ comparación marcada por las líneas. ANOVA con post-test de Tukey.

Cuando realizamos los experimentos con las células β humanas, la secreción de insulina no presentó diferencias significativas al sobreexpresar BCL-XL (Figura 16) respecto a los valores del control, siguiendo el comportamiento normal de secreción de insulina en la célula β . El paso de 0 mM glucosa a una concentración estimuladora aumentó 3.70 veces la secreción de insulina (de 2.30 ± 0.10 a 8.51 ± 0.77 ng insulina/hora). Sin

embargo, no se logró forzar la secreción de insulina por encima de la secreción frente 20 mM de glucosa con ninguno de los estímulos de secreción máxima en ninguno de los dos grupos celulares.

Estos resultados indican que la sobreexpresión de BCL-XL no afectó a la secreción de insulina de EndoC-βH1. Tampoco se encontraron diferencias significativas en el contenido de insulina respecto al control (8037.29 ± 261.64 ng insulina/ 10^6 células).

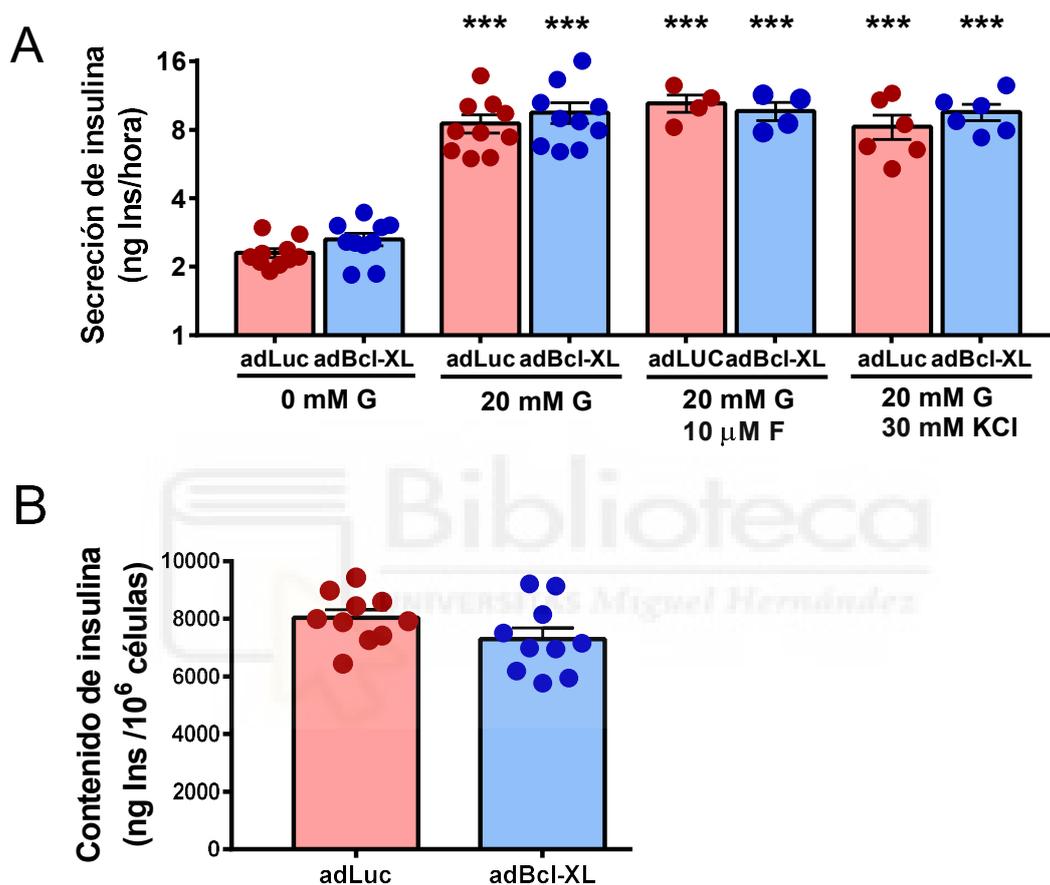


Figura 16. Efecto de la sobreexpresión de BCL-XL en la secreción de insulina estimulada por secretagogos en EndoC-βH1. **(A)** Secreción de insulina en células infectadas con adLuc (rojo) o adBcl-XL (azul) en diferentes condiciones secuenciales: 0 mM glucosa, 20 mM glucosa, y 10 μM forskolina o 30 mM de KCl. **(B)** Contenido de insulina por cada 10^6 células infectadas con adLuc (rojo) o adBcl-XL (azul). Las barras muestran media \pm SEM de 10 experimentos independientes (4 con forskolina, 6 con KCl). *** $p < 0.001$ en comparación con 0 mM glucosa; *one-way* ANOVA con post-test de Tukey.

Evaluación de la viabilidad celular

El efecto de la sobreexpresión de BCL-XL en la viabilidad celular de INS-1E (Figura 17) y de EndoC-βH1 (Figura 18) se analizó 48 horas después del tratamiento con citoquinas

y palmitato, mediante el conteo con tinción HO/PI. El nivel de expresión de BCL-XL se comprobó mediante Western Blot en células no infectadas con adenovirus (*Mock*), infectadas con adLuc e infectadas con adBcl-XL, empleando células no expuestas a estímulos proapoptóticos y células expuestas a citoquinas (IFN- γ + IL-1 β) o 0.5 mM de palmitato.

La sobreexpresión de BCL-XL no produjo cambios en el porcentaje de apoptosis basal de INS-1E respecto al control (infectadas con adLuc, 2.7 ± 0.2 %), estando estos valores dentro de la normalidad para la célula β pancreática de rata.

El tratamiento con citoquinas proinflamatorias no aumentó significativamente el porcentaje de apoptosis en las células con sobreexpresión de BCL-XL, a diferencia de las células control, que alcanzaron un 15.3 ± 0.7 % de apoptosis. Esto supuso una protección del 38.8% de la apoptosis inducida por citoquinas al sobreexpresar BCL-XL.

Se realizaron 2 experimentos independientes de exposición de células INS-1E a una concentración fisiopatológica de palmitato, en los que no aumentó el porcentaje de apoptosis. Por tanto, no fue posible valorar el efecto de la sobreexpresión de BCL-XL.

La infección *Mock* (células sometidas al mismo procedimiento que las células infectadas con adLuc y adBcl-XL, pero sin añadir el virus) no afectó a la viabilidad ni a la expresión de BCL-XL (resultados de viabilidad no mostrados).

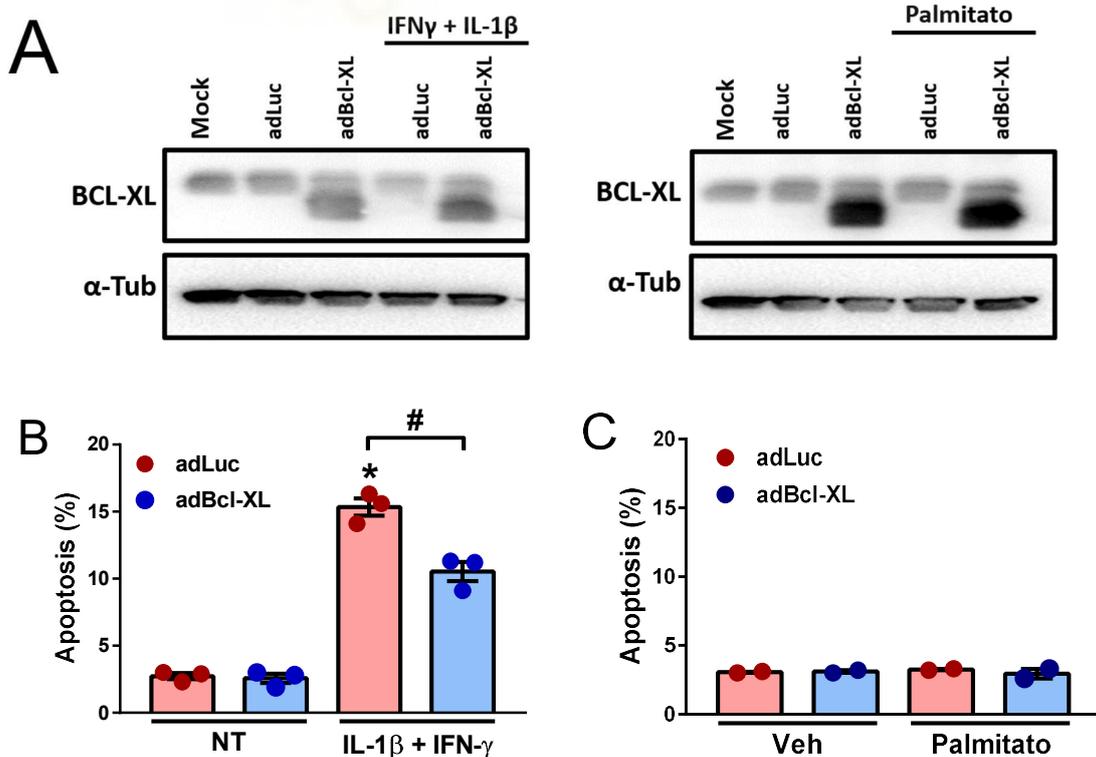
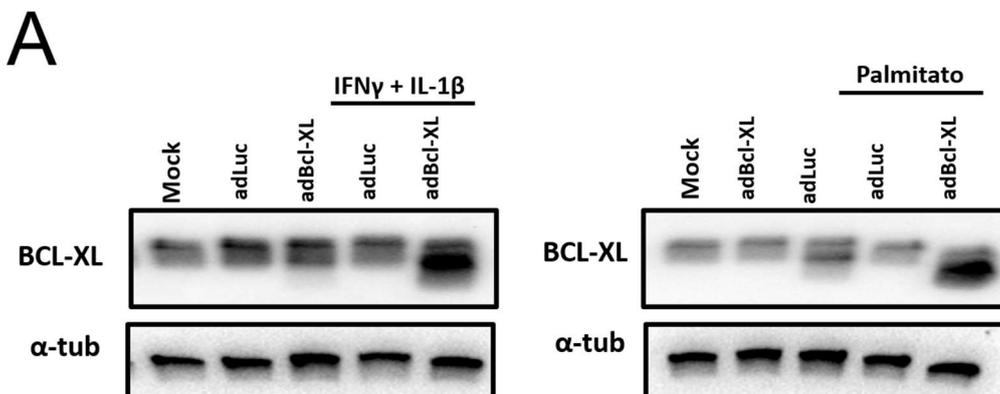


Figura 17. Efecto de la sobreexpresión de BCL-XL en la viabilidad celular de INS-1E. **(A)** Figura representativa de un análisis Western Blot de BCL-XL y α -tubulina. Se muestra la expresión basal de BCL-XL frente a la expresión en presencia de IFN- γ + IL-1 β o palmitato, en células no infectadas (*Mock*), infectadas con adLuc e infectadas con adBcl-XL (N=4). **(B)** Porcentaje de apoptosis en células infectadas con adLuc o adBcl-XL, en ausencia (NT) o presencia de citoquinas. **(C)** Porcentaje de apoptosis en células infectadas con adLuc o adBcl-XL en presencia de palmitato o de su vehículo (Veh). El gráfico de barras muestra media \pm SEM de 2-3 experimentos independientes; *p < 0.05 comparación con NT, #p < 0.05 comparación con adBcl-XL más citoquinas; RM *one-way* ANOVA con post-test de Bonferroni.

La sobreexpresión de BCL-XL en la línea celular EndoC- β H1 (Figura 18) no afectó al porcentaje de apoptosis basal de la línea celular, que se encuentra en torno al 10 % (Juan-Mateu et al., 2017). En cambio, las células infectadas con adBcl-XL mostraron una reducción significativa en el porcentaje de apoptosis mediada por citoquinas respecto al control, que pasó de 9.2 ± 0.8 % a 18.6 ± 0.5 %. Esto supuso una protección del 72.9% frente la apoptosis mediada por citoquinas proinflamatorias en células con sobreexpresión de BCL-XL.

En el caso de apoptosis mediada por estrés metabólico, la protección debida a la sobreexpresión de BCL-XL fue de un 98.6%, restaurando los valores de apoptosis a la apoptosis basal de la línea celular. En cambio, las células con expresión exclusivamente endógena de BCL-XL aumentaron significativamente el porcentaje de apoptosis en presencia de palmitato (17.6 ± 1.0 %). El vehículo del palmitato no afectó a la viabilidad celular.

Por tanto, existe una reducción significativa en el porcentaje de apoptosis inducida por citoquinas y por palmitato en célula β humana al sobreexpresar BCL-XL.



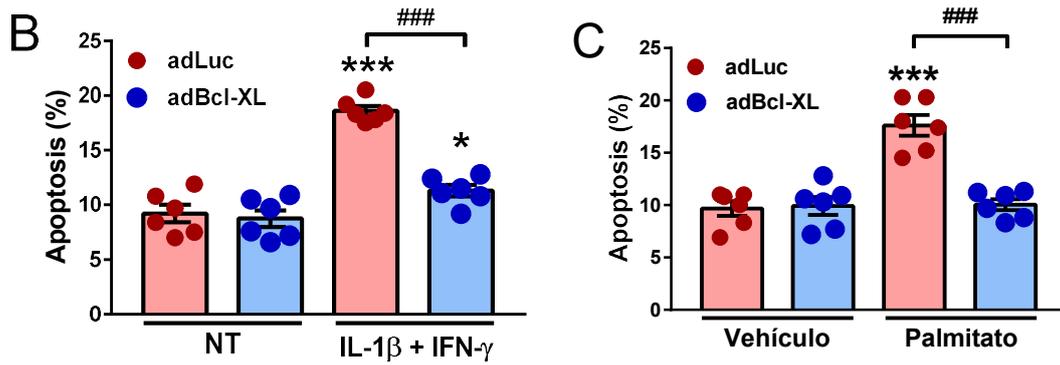


Figura 18. Efecto de la sobreexpresión de BCL-XL en la viabilidad celular de EndoC-βH1. **(A)** Figura representativa de un Western Blot de BCL-XL y α-tubulina. Se muestra la expresión basal de BCL-XL frente a la expresión en presencia de IFN-γ + IL-1β o palmitato, en células no infectadas (*Mock*), infectadas con adLuc e infectadas con adBcl-XL (N=4). **(B)** Porcentaje de apoptosis en células infectadas con adLuc (rojo) o adBcl-XL (azul), en ausencia (NT) o presencia de citoquinas. **(C)** Porcentaje de apoptosis en células infectadas con adLuc o adBcl-XL, en presencia de palmitato o de su vehículo. Los gráficos B y C muestran la media ± SEM de 6 experimentos independientes. En ambos casos, se ha realizado *one-way* ANOVA con post-test de Bonferroni. *p < 0.05, ***p < 0.0001 comparación con NT o Vehículo, ###p < 0.0001 comparación indicada por barras.



Discusión y Conclusiones

La diabetes es una enfermedad crónica de alta prevalencia e incidencia, que afecta a 463 millones de personas en el mundo. Tiene un gran efecto negativo en la calidad de vida de los pacientes, que en la mayoría de los casos acaban presentando graves complicaciones asociadas a la enfermedad tanto en diabetes tipo 1 como en diabetes tipo 2. Además, el tratamiento de la diabetes y sus complicaciones supone un alto coste económico para la sanidad pública. Los avances en el desarrollo de nuevas terapias que retrasen o limiten la muerte de células β en diabetes tipo 1 y tipo 2 son fundamentales para la mejora de la calidad de vida y el pronóstico de la patogénesis de la diabetes, limitando a la vez el gasto público en sus tratamientos.

La disfunción y pérdida de masa de célula β pancreática son los factores determinantes de la patogénesis de la diabetes tipo 1 y tipo 2. Actualmente, los tratamientos para la diabetes tipo 1 y tipo 2 abordan la sintomatología de cada enfermedad, mediante la administración subcutánea de insulina en pacientes diabéticos tipo 1 y el tratamiento con fármacos antidiabéticos en pacientes diabéticos tipo 2, que en estadios avanzados de la enfermedad requieren insulino terapia para compensar la disfunción de la célula β .

La muerte de célula β en la diabetes tipo 1 está mediada principalmente por dos procesos: 1) a través de la vía extrínseca de la apoptosis, en la que la activación de los receptores de muerte Fas por interacción con FasL de los linfocitos T citotóxicos (Alberts et al., 2010), y 2) a través de la vía intrínseca de la apoptosis, mediada por el efecto deletéreo de las citoquinas secretadas por macrófagos, linfocitos y la propia célula β .

Las estrategias utilizadas hasta la fecha para retrasar la apoptosis de las células β en diabetes tipo 1 centran los esfuerzos terapéuticos en el primero de esos procesos a través de la modulación del sistema inmune. Ejemplos recientes de estas terapias son: el tratamiento oral con autoantígenos como la insulina (Krischer et al., 2017), el desarrollo de vacunas de DNA que induzcan tolerancia a los antígenos de célula β (Fernández, 2020) o la inmunoterapia con anticuerpos monoclonales anti-CD3 (Herold et al., 2019), que han logrado retrasar el debut en diabetes tipo 1 en individuos de alto riesgo, como familiares directos de diabéticos tipo 1.

Estos esfuerzos han logrado retrasar el comienzo de la enfermedad unos pocos años, un logro positivo, pero no suficiente. Por lo tanto, la obtención de una estrategia terapéutica que redujese significativamente la muerte celular inducida por citoquinas podría mejorar enormemente el efecto terapéutico de las inmunoterapias en diabetes tipo 1. Los esfuerzos de la comunidad científica por limitar el efecto deletéreo de las

citoquinas en la célula β han resultado, hasta ahora, poco prometedores (Allison et al., 2000; Luciani et al., 2012; Zhou et al., 2000), por lo que son necesarios más estudios para encontrar estrategias terapéuticas eficaces en la prevención de la muerte de la célula β pancreática mediada por citoquinas.

La prevención del desarrollo de diabetes tipo 2 en individuos insulinoresistentes pasa por la reducción de la demanda de insulina en los tejidos periféricos mediante tratamientos con fármacos antidiabéticos, como análogos de GLP-1 o metformina (DeFronzo and Abdul-Ghani, 2011). Estos fármacos producen diferentes efectos secundarios entre los que destaca la hipoglucemia (Chaudhury et al., 2017). Actualmente, los esfuerzos por evitar o ralentizar la progresión de la disfunción de la célula β incluyen procedimientos invasivos o de difícil adhesión por parte de los pacientes como la cirugía bariátrica, las dietas de muy bajo aporte calórico o la insulinoterapia intensiva (Boughton, Munro and Whyte, 2017).

Los mecanismos moleculares que desencadenan la muerte de la célula β son diferentes en la diabetes tipo 1 y tipo 2 (Cnop et al., 2005), pero en ambos tipos de diabetes la muerte de la célula β ocurre a través de la vía intrínseca de la apoptosis, estrechamente regulada por la familia de proteínas BCL-2. La proteína antiapoptótica BCL-XL forma parte de esta familia, y su alto nivel de expresión en la célula α pancreática protege a este tipo celular del estrés metabólico en la diabetes tipo 2 (Marroquí et al., 2015 b).

El objetivo principal de este trabajo ha sido investigar si la sobreexpresión de BCL-XL en célula β pancreática puede proteger a estas células del estrés inflamatorio y del estrés metabólico observados en la diabetes tipo 1 y tipo 2, respectivamente. Con esta finalidad, se sobreexpresó BCL-XL en dos modelos de célula β pancreática: INS-1E procedente de rata, al ser un modelo celular de uso común en diabetología, y EndoC- β H1 de origen humano, de gran similitud con las células β primarias (Tsonkova et al., 2018).

En base a nuestro experimento dosis-respuesta, donde se demostró que hasta un M.O.I. 5 no tenía efectos en la viabilidad celular, se decidió utilizar esta multiplicidad de infección de un vector adenoviral para la sobreexpresión de BCL-XL (adBcl-XL). Su efecto en la célula β se comparó con el de un vector adenoviral que contenía el gen de la luciferasa (adLuc), empleado como control negativo. La infección adenoviral logró un aumento de 7 veces sobre la expresión endógena de BCL-XL en INS-1E y de 5 veces en EndoC- β H1, valores similares a los encontrados para la célula α sobre la expresión en célula β (Marroquí et al. en 2015 b). Esta aproximación para aumentar la expresión de BCL-XL se ha empleado con anterioridad para incrementar transitoriamente la

expresión de BCL-XL en células madre hematopoyéticas humanas y asegurar su viabilidad para trasplante (Kollek et al., 2017) y en la protección de células neuronales PC12 frente a la apoptosis mediada por BAX (Shinoura et al., 2000). Estos últimos investigadores encontraron además que la sobreexpresión de BCL-XL proporcionaba una mayor protección que la sobreexpresión de BCL-2.

El siguiente paso fue investigar si la sobreexpresión de BCL-XL era capaz de proteger a las células β del estrés inflamatorio observado en el islote pancreático durante el desarrollo de la diabetes tipo 1. Las condiciones proinflamatorias de la diabetes tipo 1 se reprodujeron mediante una aproximación cercana a las condiciones fisiológicas, empleando un cóctel de citoquinas. Se comprobó que la sobreexpresión de BCL-XL fue capaz de proteger a las células β pancreáticas de la apoptosis inducida por citoquinas en los dos modelos utilizados, alcanzando una protección del 40 % en INS-1E y del 99 % en EndoC- β H1.

Tras confirmar que la sobreexpresión de BCL-XL ejerce un papel protector frente al estrés inflamatorio en la célula β pancreática, se decidió averiguar si este efecto se reproduciría en células β expuestas a condiciones de lipotoxicidad típicas de la diabetes tipo 2. Mientras que la sobreexpresión de BCL-XL protegió las células β humanas EndoC- β H1 de la apoptosis mediada por una concentración fisiopatológica de palmitato hasta un 73 %, no se encontró ningún efecto en las células β de rata INS-1E. Sin embargo, otros autores han demostrado que la concentración utilizada de palmitato, 0.5 mM, induce apoptosis tanto en la célula β primaria de rata como en la línea celular INS-1E (Kharroubi et al., 2004). Por tanto, consideramos que es necesario realizar nuevos experimentos con otros pases de INS-1E y preparaciones nuevas de palmitato para reafirmar nuestros resultados.

Otros autores han demostrado con éxito la capacidad de BCL-XL de preservar la viabilidad de la célula beta pancreática. La transducción de BCL-XL o de su subunidad BH4 en islotes humanos y de primates no humanos protegió a los islotes un 20-40 % de la apoptosis inducida por estaurosporina, y un 40-60 % de la muerte inducida por privación de nutrientes. También fue capaz de inhibir la activación espontánea de caspasas y protegió significativamente de la citotoxicidad inducida por IL-1 β (Klein et al., 2004). Zhou et al., en el 2000, estudiaron la sobreexpresión de BCL-XL en célula β como estrategia preventiva de la muerte celular en ratones transgénicos, cuya expresión de la proteína antiapoptótica se encontraba bajo el promotor del gen de la insulina. En este trabajo, demostraron que un aumento de 2-3 veces en la expresión de BCL-XL era capaz de proteger a la célula β de la apoptosis inducida por taspigargina, y que el efecto

de las citoquinas proinflamatorias en los islotes pancreáticos de dichos ratones era más bien escaso.

Por otra parte, la inhibición química de BCL-2 y de BCL-XL mediante el uso de las pequeñas moléculas C6 e YC137 aumenta la respuesta de la célula β de ratón a glucosa, en forma de aumento de los niveles de NAD(P)H y de las oscilaciones de Ca^{2+} intracelular (Luciani et al., 2013). Los efectos encontrados en el presente trabajo en la señal de Ca^{2+} intracelular al sobreexpresar BCL-XL en INS-1E coinciden con las observaciones de Luciani et al. en el modelo de ratón. Mientras que estos investigadores demostraron un aumento en la respuesta intracelular de Ca^{2+} al inhibir BCL-2 y BCL-XL, en este trabajo se encontró una reducción del 5 % en la respuesta intracelular de Ca^{2+} tras la sobreexpresión de BCL-XL. Un efecto similar se observó en ratones transgénicos para la sobreexpresión de BCL-XL bajo el promotor del gen de la insulina (Zhou et al., 2000). El efecto de la sobreexpresión de BCL-XL en las oscilaciones de Ca^{2+} intracelular de la célula β humana se ha estudiado por primera vez en este trabajo, sin encontrarse diferencias en las oscilaciones de Ca^{2+} intracelular en respuesta a una concentración estimuladora de glucosa o a KCl. Sin embargo, los resultados obtenidos hasta el momento muestran un incremento significativo del 22 % en la concentración basal de Ca^{2+} intracelular al sobreexpresar BCL-XL, sin que esta diferencia se traduzca en cambios en la secreción de insulina. Actualmente, no contamos con suficientes células registradas para concluir el efecto de la sobreexpresión de BCL-XL en las oscilaciones de Ca^{2+} intracelular de EndoC- β H1. Sin embargo, en base a la localización celular de BCL-XL asociado a múltiples compartimentos de Ca^{2+} intracelular, es posible hipotetizar que su mayor expresión podría estar favoreciendo una menor captación de Ca^{2+} por el ER.

Estudios previos ya han demostrado que BCL-2 interactúa por contacto directo con la ATPasa de Ca^{2+} SERCA en el ER (Dremina et al., 2004), inhibiendo el transporte de Ca^{2+} al interior del ER. Una posible interacción de BCL-XL con los receptores de IP_3 del ER podría estar afectando a la entrada capacitiva de Ca^{2+} y su almacenamiento en el ER (Thrower, Hagar and Ehrlich, 2001). Finalmente, la sobreexpresión de BCL-XL podría estar hiperpolarizando levemente la membrana celular de la célula β , aumentando así la probabilidad de estado abierto de los canales VDCC (Atwater, Dawson, Eddlestone and Rojas, 1981) y la entrada de Ca^{2+} desde el exterior.

Otras diferencias encontradas en este trabajo entre los modelos de célula β de rata y humana tiene que ver con el efecto de la sobreexpresión de BCL-XL en la secreción de insulina en respuesta a estímulos secretores. Mientras que en INS-1E la sobreexpresión

redujo un 21 % y un 31 % la secreción de insulina estimulada por glucosa y por glucosa más forskolina, respectivamente, la sobreexpresión de BCL-XL no produjo ningún cambio en la secreción de insulina en las células β humanas. Nuevamente, Luciani et al. encontraron un aumento en la secreción de insulina de ratones β KO para BCL-XL (con eliminación selectiva e inducible del gen Bcl-XL en las células β), y Zhou et al. encontraron una reducción de la secreción de insulina en los ratones transgénicos con sobreexpresión de BCL-XL. Este efecto podría explicarse por el papel que juegan BCL-XL y BCL-2 moderando la respuesta a glucosa de las células β en roedores (Luciani et al., 2013).

Las discrepancias observadas en el efecto de la sobreexpresión de BCL-XL entre el modelo de célula β de rata y humana pueden ser atribuibles a diferencias en la importancia que tiene la proteína BCL-XL en el control de la apoptosis y del tráfico de Ca^{2+} intracelular en cada una, teniendo un mayor peso en el control de la secreción en roedores, pero actuando principalmente en el control de la apoptosis en humanos. Otros autores también referencian diferencias entre la fisiopatología de roedores y de humanos, como por ejemplo, la obtención de un fenotipo opuesto al humano para la misma mutación en el canal K_{ATP} (Hugill, Shimomura, Ashcroft and Cox, 2010), las múltiples diferencias en su respuesta enzimática al estrés oxidativo (Godin and Garnett, 1992) o su mayor susceptibilidad a compuestos citotóxicos como la aloxana o la estreptozotocina (Eizirik et al., 1994) y el diferente papel de la enzima iNOS en la muerte celular inducida por citoquinas proinflamatorias (Brozzi et al., 2015). Teniendo en cuenta la complejidad de las redes metabólicas tanto en roedores como en humanos, sería recomendable el uso de islotes de donantes cadavéricos humanos, para confirmar los resultados obtenidos en los experimentos que se muestran en este trabajo.

Nuestros resultados muestran que la sobreexpresión de BCL-XL protege las células β humanas frente a la apoptosis inducida por citoquinas proinflamatorias o por palmitato, lo que sugiere que esta proteína podría ser utilizada como blanco terapéutico. La terapia génica con BCL-XL se ha probado en otros tejidos, como el endotelio corneal para asegurar la viabilidad en los trasplantes de córnea (Barcia, Dana and Kazlauskas, 2007) y en el corazón de ratas Lewis para proteger a los cardiomiocitos después de un episodio isquémico, para prevenir el fallo cardíaco (Huang et al., 2003).

En conclusión, la sobreexpresión de BCL-XL parece ser una estrategia terapéutica eficaz en la protección de la célula β pancreática en condiciones de diabetes tipo 1 y tipo 2. El aumento de la expresión de BCL-XL sobre la expresión endógena en la línea de célula β de rata INS-1E fue capaz de contrarrestar los efectos deletéreos de las

citoquinas, pero estuvo asociada a una disminución en la respuesta a glucosa de la secreción de insulina. En cambio, el efecto de un aumento en la expresión de BCL-XL en la línea de célula β humana EndoC- β H1 produjo una fuerte protección frente a la apoptosis inducida por citoquinas como a la inducida por palmitato, sin afectar a la respuesta a glucosa o secretagogos. Estos hallazgos confirman que la expresión de BCL-XL no sólo juega un papel determinante en la supervivencia celular de la célula α pancreática en condiciones de diabetes, sino que su nivel de expresión en la célula β puede ser un factor crucial que contribuya a determinar qué porcentaje de célula β muere en las condiciones proapoptóticas de la diabetes tipo 1 y tipo 2. Además, abre la puerta a futuros estudios sobre el papel de otros mecanismos de supervivencia de la célula α y su posible uso como diana terapéutica en célula β .



Bibliografía

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P., 2010. Molecular Biology Of The Cell. 5th ed. *Omega*, pp.1115-1129.

Allison, J., Thomas, H., Beck, D., Brady, J., Lew, A., Elefanty, A., Kosaka, H., Kay, T., Huang, D. and Strasser, A., 2000. Transgenic overexpression of human Bcl-2 in islet β cells inhibits apoptosis but does not prevent autoimmune destruction. *International Immunology*, 12(1), pp.9-17. <https://doi.org/10.1093/intimm/12.1.9>

Asfari, M., Janjic, D., Meda, P., Li, G., Halban, P. and Wollheim, C., 1992. Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology*, 130(1), pp.167-178. PMID: 1370150
[doi:10.1210/endo.130.1.1370150](https://doi.org/10.1210/endo.130.1.1370150)

Atwater, I., Dawson, C., Eddlestone, G. and Rojas, E., 1981. Voltage noise measurements across the pancreatic beta-cell membrane: calcium channel characteristics. *The Journal of Physiology*, 314(1), pp.195-212. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1981.sp013701>

Banjara, S., Suraweera, C., Hinds, M. and Kvansakul, M., 2020. The Bcl-2 Family: Ancient Origins, Conserved Structures, and Divergent Mechanisms. *Biomolecules*, 10(1), p.128. [doi:10.3390/biom10010128](https://doi.org/10.3390/biom10010128)

Barbosa, R., Silva, A., Tomé, A., Stamford, J., Santos, R. and Rosário, L., 1998. Control of pulsatile 5-HT/insulin secretion from single mouse pancreatic islets by intracellular calcium dynamics. *The Journal of Physiology*, 510(1), pp.135-143. [doi:10.1111/j.1469-7793.1998.135bz.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.135bz.x)

Barcia, R., Dana, M. and Kazlauskas, A., 2007. Corneal Graft Rejection Is Accompanied by Apoptosis of the Endothelium and Is Prevented by Gene Therapy With Bcl-xL. *American Journal of Transplantation*, 7(9), pp.2082-2089. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2007.01897.x>

Billen, L., Kokoski, C., Lovell, J., Leber, B. and Andrews, D., 2008. BCL-XL Inhibits Membrane Permeabilization by Competing with Bax. *Plos Biology*, 6(6), p.e147. [doi:10.1371/journal.pbio.0060147](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060147)

Boughton, C., Munro, N. and Whyte, M., 2017. Targeting beta-cell preservation in the management of type 2 diabetes. *British Journal of Diabetes*, 17(4), pp.134-144 <https://doi.org/10.15277/bjd.2017.148>

Brozzi, F., Nardelli, T., Lopes, M., Millard, I., Barthson, J., Igoillo-Esteve, M., Grieco, F., Villate, O., Oliveira, J., Casimir, M., Bugliani, M., Engin, F., Hotamisligil, G., Marchetti, P. and Eizirik, D., 2015. Cytokines induce endoplasmic reticulum stress in human, rat and mouse beta cells via different mechanisms. *Diabetologia*, 58(10), pp.2307-2316. DOI: 10.1007/s00125-015-3669-6

Camunas-Soler, J., Dai, X., Hang, Y., Bautista, A., Lyon, J., Suzuki, K., Kim, S., Quake, S. and MacDonald, P., 2019. Pancreas patch-seq links physiologic dysfunction in diabetes to single-cell transcriptomic phenotypes. *Biorxiv pre-print*. <https://doi.org/10.1101/555110>

Carrington, E., McKenzie, M., Jansen, E., Myers, M., Fynch, S., Kos, C., Strasser, A., Kay, T., Scott, C. and Allison, J., 2009. Islet β -Cells Deficient in BCL-XL Develop but Are Abnormally Sensitive to Apoptotic Stimuli. *Diabetes*, 58(10), pp.2316-2323. doi: 10.2337/db08-1602

Cerf, M., 2013. B Cell Dysfunction and Insulin Resistance. *Frontiers in Endocrinology*, 4. doi: 10.3389/fendo.2013.00037

Chen, W., Salojin, K., Mi, Q., Grattan, M., Meagher, T., Zucker, P. and Delovitch, T., 2004. Insulin-Like Growth Factor (IGF)-I/IGF-Binding Protein-3 Complex: Therapeutic Efficacy and Mechanism of Protection against Type 1 Diabetes. *Endocrinology*, 145(2), pp.627-638. <https://doi.org/10.1210/en.2003-1274>

Chaudhury, A., Duvor, C., Reddy Dendi, V., Kraleti, S., Chada, A., Ravilla, R., Marco, A., Shekhawat, N., Montales, M., Kuriakose, K., Sasapu, A., Beebe, A., Patil, N., Musham, C., Lohani, G. and Mirza, W., 2017. Clinical Review of Antidiabetic Drugs: Implications for Type 2 Diabetes Mellitus Management. *Frontiers in Endocrinology*, 8. Doi:10.3389/fendo.2017.00006

Cnop, M., Abdulkarim, B., Bottu, G., Cunha, D., Igoillo-Esteve, M., Masini, M., Turatsinze, J., Griebel, T., Villate, O., Santin, I., Bugliani, M., Ladriere, L., Marselli, L., McCarthy, M., Marchetti, P., Sammeth, M. and Eizirik, D., 2013. RNA Sequencing Identifies Dysregulation of the Human Pancreatic Islet Transcriptome by the Saturated Fatty Acid Palmitate. *Diabetes*, 63(6), pp.1978-1993. doi: 10.2337/db13-1383

Cnop, M., Welsh, N., Jonas, J., Jorns, A., Lenzen, S. and Eizirik, D., 2005. Mechanisms of Pancreatic β -Cell Death in Type 1 and Type 2 Diabetes: Many Differences, Few Similarities. *Diabetes*, 54(Supplement 2), pp. S97-S107. https://doi.org/10.2337/diabetes.54.suppl_2.S97

Compton, S. and Jones, C., 1985. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical Biochemistry*, 151(2), pp.369-374. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90190-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90190-3)

Costes, S., 2018. Targeting protein misfolding to protect pancreatic β -cells in type 2 diabetes. *Current Opinion in Pharmacology*, 43, pp.104-110. Volume 43, Pages 104-110, ISSN 1471-4892 <https://doi.org/10.1016/j.coph.2018.08.016>

Cunha, D., Hekerman, P., Ladriere, L., Bazarra-Castro, A., Ortis, F., Wakeham, M., Moore, F., Rasschaert, J., Cardozo, A., Bellomo, E., Overbergh, L., Mathieu, C., Lupi, R., Hai, T., Herchuelz, A., Marchetti, P., Rutter, G., Eizirik, D. and Cnop, M., 2008. Initiation and execution of lipotoxic ER stress in pancreatic β -cells. *Journal of Cell Science*, 121(14), pp.2308-2318. doi:10.1242/jcs.026062

DeFronzo, R. and Abdul-Ghani, M., 2011. Preservation of β -Cell Function: The Key to Diabetes Prevention. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 96(8), pp.2354-2366. DOI: 10.1210/jc.2011-0246

Dremina, E., Sharov, V., Kumar, K., Zaidi, A., Michaelis, E. and Schöneich, C., 2004. Anti-apoptotic protein Bcl-2 interacts with and destabilizes the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA). *Biochemical Journal*, 383(2), pp.361-370. PMID: 15245329 PMCID: PMC1134078 DOI: 10.1042/BJ20040187

Eizirik, D., Colli, M. and Ortis, F., 2009. The role of inflammation in insulinitis and β -cell loss in type 1 diabetes. *Nature Reviews Endocrinology*, 5(4), pp.219-226. doi: 10.1038/nrendo.2009.21

Eizirik, D., Pasquali, L. and Cnop, M., 2020. Pancreatic β -cells in type 1 and type 2 diabetes mellitus: different pathways to failure. *Nature Reviews Endocrinology*, 16(7), pp.349-362.

Eizirik, D., Pipeleers, D., Ling, Z., Welsh, N., Hellerstrom, C. and Andersson, A., 1994. Major species differences between humans and rodents in the susceptibility to pancreatic beta-cell injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(20), pp.9253-9256. doi: 10.1073/pnas.91.20.9253

Eizirik, D., Sammeth, M., Bouckenooghe, T., Bottu, G., Sisino, G., Igoillo-Esteve, M., Ortis, F., Santin, I., Colli, M., Barthson, J., Bouwens, L., Hughes, L., Gregory, L., Lunter, G., Marselli, L., Marchetti, P., McCarthy, M. and Cnop, M., 2012. The Human Pancreatic Islet Transcriptome: Expression of Candidate Genes for Type 1 Diabetes and the Impact

of Pro-Inflammatory Cytokines. *PLoS Genetics*, 8(3), p.e1002552. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002552>

Farack, L., Golan, M., Egozi, A., Dezorella, N., Bahar Halpern, K., Ben-Moshe, S., Garzilli, I., Tóth, B., Roitman, L., Krizhanovsky, V. and Itzkovitz, S., 2019. Transcriptional Heterogeneity of Beta Cells in the Intact Pancreas. *Developmental Cell*, 48(1), pp.115-125.e4. doi: 10.1016/j.devcel.2018.11.001.

Faustin, B., Chen, Y., Zhai, D., Negrate, G., Lartigue, L., Satterthwait, A. and Reed, J., 2009. Mechanism of Bcl-2 and Bcl-XL inhibition of NLRP1 inflammasome: Loop domain-dependent suppression of ATP binding and oligomerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(10), pp.3935-3940. doi: 10.1073/pnas.0809414106

Fernández, J., 2020. 843-P: Optimization of DNA Vaccine Platforms for Type 1 Diabetes. *Diabetes*, 69(Supplement 1), p.843-P. <https://doi.org/10.2337/db20-843-P>

Fraze, E., Donner, C., Swislocki, A., Chiou, Y., Chen, Y. and Reaven, G., 1985. Ambient Plasma Free Fatty Acid Concentrations in Noninsulin-Dependent Diabetes Mellitus: Evidence for Insulin Resistance. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 61(5), pp.807-811. doi: 10.1210/jcem-61-5-807

Grunnet, L., Aikin, R., Tonnesen, M., Paraskevas, S., Blaabjerg, L., Storling, J., Rosenberg, L., Billestrup, N., Maysinger, D. and Mandrup-Poulsen, T., 2009. Proinflammatory Cytokines Activate the Intrinsic Apoptotic Pathway in β -Cells. *Diabetes*, 58(8), pp.1807-1815. <https://doi.org/10.2337/db08-0178>

Gysemans, C., Callewaert, H., Overbergh, L. and Mathieu, C., 2008. Cytokine signalling in the β -cell: a dual role for IFN γ . *Biochemical Society Transactions*, 36(3), pp.328-333. doi: 10.1042/BST0360328

Godin, D. and Garnett, M., 1992. Species-related variations in tissue antioxidant status—I. Differences in antioxidant enzyme profiles. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 103(3), pp.737-742. doi: 10.1016/0305-0491(92)90399-c

Gurzov, E. and Eizirik, D., 2011. Bcl-2 proteins in diabetes: mitochondrial pathways of β -cell death and dysfunction. *Trends in Cell Biology*, 21(7), pp.424-431. doi:10.1016/j.tcb.2011.03.001

Harper, M. and Poole, A., 2012. Bcl-xL-inhibitory BH3 mimetic ABT-737 depletes platelet calcium stores. *Blood*, 119(18), pp.4337-4338. DOI: 10.1182/blood-2012-02-413070

Herold, K., Bundy, B., Long, S., Bluestone, J., DiMeglio, L., Dufort, M., Gitelman, S., Gottlieb, P., Krischer, J., Linsley, P., Marks, J., Moore, W., Moran, A., Rodriguez, H., Russell, W., Schatz, D., Skyler, J., Tsalikian, E., Wherrett, D., Ziegler, A. and Greenbaum, C., 2019. An Anti-CD3 Antibody, Teplizumab, in Relatives at Risk for Type 1 Diabetes. *New England Journal of Medicine*, 381(7), pp.603-613. Doi: 10.1056/NEJMoa1902226

Holohan, C., Szegezdi, E., Ritter, T., O'Brien, T. and Samali, A., 2008. Cytokine-induced β -cell apoptosis is NO-dependent, mitochondria-mediated and inhibited by BCL-XL. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12(2), pp.591-606. doi:10.1111/j.1582-4934.2007.00191.x

Huang, J., Ito, Y., Morikawa, M., Uchida, H., Kobune, M., Sasaki, K., Abe, T. and Hamada, H., 2003. Bcl-xL gene transfer protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 311(1), pp.64-70. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.09.160>

Hugill, A., Shimomura, K., Ashcroft, F. and Cox, R., 2010. A mutation in KCNJ11 causing human hyperinsulinism (Y12X) results in a glucose-intolerant phenotype in the mouse. *Diabetologia*, 53(11), pp.2352-2356. Doi: 10.1007/s00125-010-1866-x

International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 9th edn. Brussels, Belgium: *International Diabetes Federation*, 2019. <http://www.diabetesatlas.org>

Juan-Mateu, J., Alvelos, M., Turatsinze, J., Villate, O., Lizarraga-Mollinedo, E., Grieco, F., Marroquí, L., Bugliani, M., Marchetti, P. and Eizirik, D., 2017. SRp55 Regulates a Splicing Network That Controls Human Pancreatic β -Cell Function and Survival. *Diabetes*, 67(3), pp.423-436. DOI: 10.2337/db17-0736

Kharroubi, I., Ladrière, L., Cardozo, A., Dogusan, Z., Cnop, M. and Eizirik, D., 2004. Free Fatty Acids and Cytokines Induce Pancreatic β -Cell Apoptosis by Different Mechanisms: Role of Nuclear Factor- κ B and Endoplasmic Reticulum Stress. *Endocrinology*, 145(11), pp.5087-5096. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0478>

Klein, D., Ribeiro, M., Mendoza, V., Jayaraman, S., Kenyon, N., Pileggi, A., Molano, R., Inverardi, L., Ricordi, C. and Pastori, R., 2004. Delivery of Bcl-XL or its BH4 domain by protein transduction inhibits apoptosis in human islets. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 323(2), pp.473-478. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.08.116>

Klöppel, G., Lohr, M., Habich, K., Oberholzer, M. and Heitz, P., 1985. Islet Pathology and the Pathogenesis of Type 1 and Type 2 Diabetes mellitus Revisited. *Pathology and Immunopathology Research*, 4(2), pp.110-125. PMID: 3901180 DOI: 10.1159/000156969

Kollek, M., Voigt, G., Molnar, C., Murad, F., Bertele, D., Krombholz, C., Bohler, S., Labi, V., Schiller, S., Kunze, M., Geley, S., Niemeyer, C., Garcia-Saez, A. and Erlacher, M., 2017. Transient apoptosis inhibition in donor stem cells improves hematopoietic stem cell transplantation. *Journal of Experimental Medicine*, 214(10), pp.2967-2983. DOI: 10.1084/jem.20161721

Krischer, J., Schatz, D., Bundy, B., Skyler, J. and Greenbaum, C., 2017. Effect of Oral Insulin on Prevention of Diabetes in Relatives of Patients With Type 1 Diabetes. *JAMA*, 318(19), p.1891. DOI: 10.1001/jama.2017.17070

Lema, C., Varela-Ramirez, A., and Aguilera, R. J., 2011. Differential nuclear staining assay for high-throughput screening to identify cytotoxic compounds. *Current cellular biochemistry*, 1(1), 1–14. PMID: 27042697

Li, H., Chen, Y., Jones, A., Sanger, R., Collis, L., Flannery, R., McNay, E., Yu, T., Schwarzenbacher, R., Bossy, B., Bossy-Wetzler, E., Bennett, M., Pypaert, M., Hickman, J., Smith, P., Hardwick, J. and Jonas, E., 2008. Bcl-xL induces Drp1-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(6), pp.2169-2174. doi: 10.1073/pnas.0711647105

Loo, L., Soetedjo, A., Lau, H., Ng, N., Ghosh, S., Nguyen, L., Krishnan, V., Choi, H., Roca, X., Hoon, S. and Teo, A., 2020. BCL-XL/BCL2L1 is a critical anti-apoptotic protein that promotes the survival of differentiating pancreatic cells from human pluripotent stem cells. *Cell Death & Disease*, 11(5). <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2589-7>

Luciani, D., White, S., Widenmaier, S., V. Saran, V., Taghizadeh, F., Hu, X., Allard, M. and Johnson, J., 2013. Bcl-2 and Bcl-xL Suppress Glucose Signaling in Pancreatic β -Cells. *Diabetes*, 63. DOI: 10.2337/db11-1464 Marroqui, L., Dos Santos, R., Fløyel, T., Grieco, F., Santin, I., Op de beeck, A., Marselli, L., Marchetti, P., Pociot, F. and Eizirik, D., 2015 a. TYK2, a Candidate Gene for Type 1 Diabetes, Modulates Apoptosis and the Innate Immune Response in Human Pancreatic β -Cells. *Diabetes*, 64(11), pp.3808-3817. doi: 10.2337/db15-0362

Marroqui, L., Masini, M., Merino, B., Grieco, F., Millard, I., Dubois, C., Quesada, I., Marchetti, P., Cnop, M. and Eizirik, D., 2015 b. Pancreatic α Cells Are Resistant To Metabolic Stress-Induced Apoptosis In Type 2 Diabetes. *EBioMedicine*. Volume 2, Issue 5, 378 – 385 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.03.012>

- Mason, K., Carpinelli, M., Fletcher, J., Collinge, J., Hilton, A., Ellis, S., Kelly, P., Ekert, P., Metcalf, D., Roberts, A., Huang, D. and Kile, B., 2007. Programmed Anuclear Cell Death Delimits Platelet Life Span. *Cell*, 128(6), pp.1173-1186. [112] M. T. Harper and A.W. Poole, "Bcl-xL-inhibitory BH3 mimetic ABT-737 depletes platelet calcium stores," *Blood*, vol. 119, pp. 4337–4338, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.037>
- Michels, J., Kepp, O., Senovilla, L., Lissa, D., Castedo, M., Kroemer, G. and Galluzzi, L., 2013. Functions Of BCL-XL at The Interface Between Cell Death And Metabolism. *International Journal of Cell Biology*. Article ID 705294, 10 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/705294>
- Muchmore, S., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R., Harlan, J., Yoon, H., Nettlesheim, D., Chang, B., Thompson, C., Wong, S., Ng, S. and Fesik, S., 1996. X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature*, 381(6580), pp.335-341. DOI: 10.1038/381335a0
- Pang, H., Luo, S., Huang, G., Xia, Y., Xie, Z. and Zhou, Z., 2020. Advances in Knowledge of Candidate Genes Acting at the β -Cell Level in the Pathogenesis of T1DM. *Frontiers in Endocrinology*, 11. doi: 10.3389/fendo.2020.00119
- Poitout, V. and Robertson, R., 2008. Glucolipotoxicity: Fuel Excess and β -Cell Dysfunction. *Endocrine Reviews*, 29(3), pp.351-366. doi: 10.1210/er.2007-0023
- Rahier, J., Guiot, Y., Goebbels, R., Sempoux, C. and Henquin, J., 2008. Pancreatic β -cell mass in European subjects with type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 10, pp.32-42. DOI: 10.1111/j.1463-1326.2008.00969.x
- Rajan, S., Choi, M., Nguyen, Q., Ye, H., Liu, W., Toh, H., Kang, C., Kamariah, N., Li, C., Huang, H., White, C., Baek, K., Grüber, G. and Yoon, H., 2015. Structural transition in Bcl-xL and its potential association with mitochondrial calcium ion transport. *Scientific Reports*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/srep10609>
- Ravassard, P., Hazhouz, Y., Pechberty, S., Bricout-Neveu, E., Armanet, M., Czernichow, P. and Scharfmann, R., 2011. A genetically engineered human pancreatic β cell line exhibiting glucose-inducible insulin secretion. *Journal of Clinical Investigation*, 121(9), pp.3589-3597. <https://doi.org/10.1172/JCI58447>
- Rhodes, C., 2005. Type 2 Diabetes-a Matter of β -Cell Life and Death? *Science*, 307(5708), pp.380-384. DOI: 10.1126/science.1104345

- Richardson, S. and Morgan, N., 2018. Enteroviral infections in the pathogenesis of type 1 diabetes: new insights for therapeutic intervention. *Current Opinion in Pharmacology*, 43, pp.11-19. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2018.07.006>
- Rorsman, P. and Ashcroft, F., 2018. Pancreatic β -Cell Electrical Activity and Insulin Secretion: Of Mice and Men. *Physiological Reviews*, 98(1), pp.117-214. doi:10.1152/physrev.00008.2017
- Santin, I., Moore, F., Colli, M., Gurzov, E., Marselli, L., Marchetti, P. and Eizirik, D., 2011. PTPN2, a Candidate Gene for Type 1 Diabetes, Modulates Pancreatic β -Cell Apoptosis via Regulation of the BH3-Only Protein Bim. *Diabetes*, 60(12), pp.3279-3288. DOI: 10.2337/db11-0758.
- Santosa, M., Low, B., Pek, N. and Teo, A., 2016. Knowledge Gaps in Rodent Pancreas Biology: Taking Human Pluripotent Stem Cell-Derived Pancreatic Beta Cells into Our Own Hands. *Frontiers in Endocrinology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00194>
- Scorrano, L. and Korsmeyer, S., 2003. Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 304(3), pp.437-444. doi: 10.1016/s0006-291x(03)00615-6
- Seino, S. and Shibasaki, T., 2005. PKA-Dependent and PKA-Independent Pathways for cAMP-Regulated Exocytosis. *Physiological Reviews*, 85(4), pp.1303-1342. doi: 10.1152/physrev.00001.2005
- Shinoura, N., Satou, R., Yoshida, Y., Asai, A., Kirino, T. and Hamada, H., 2000. Adenovirus-Mediated Transfer of Bcl-XL Protects Neuronal Cells from Bax-Induced Apoptosis. *Experimental Cell Research*, 254(2), pp.221-231. <https://doi.org/10.1006/excr.1999.4751>
- Stevens, M. and Oltean, S., 2019. Modulation of the Apoptosis Gene Bcl-x Function Through Alternative Splicing. *Frontiers in Genetics*, 10. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00804>
- Suckale, J. and Solimena, M., 2008. Pancreas islets in metabolic signaling - focus on the β -cell. *Frontiers in Bioscience*, Volume (13), p.7156. PMID: 18508724 doi: 10.2741/3218
- Thrower, E., Hagar, R. and Ehrlich, B., 2001. Regulation of Ins(1,4,5)P₃ receptor isoforms by endogenous modulators. *Trends in Pharmacological Sciences*, 22(11), pp.580-586. PMID: 11698102 DOI: 10.1016/s0165-6147(00)01809-5

Tsonkova, V., Sand, F., Wolf, X., Grunnet, L., Kirstine Ringgaard, A., Ingvorsen, C., Winkel, L., Kalisz, M., Dalgaard, K., Bruun, C., Fels, J., Helgstrand, C., Hastrup, S., Öberg, F., Vernet, E., Sandrini, M., Shaw, A., Jessen, C., Grønborg, M., Hald, J., Willenbrock, H., Madsen, D., Wernersson, R., Hansson, L., Jensen, J., Plesner, A., Alanentalo, T., Petersen, M., Grapin-Botton, A., Honoré, C., Ahnfelt-Rønne, J., Hecksher-Sørensen, J., Ravassard, P., Madsen, O., Rescan, C. and Frogne, T., 2018. The EndoC- β H1 cell line is a valid model of human beta cells and applicable for screenings to identify novel drug target candidates. *Molecular Metabolism*, 8, pp.144-157. DOI: 10.1016/j.molmet.2017.12.007

Vincenz, L., Szegezdi, E., Jager, R., Holohan, C., O'Brien, T. and Samali, A., 2011. Cytokine-Induced β -Cell Stress and Death in Type 1 Diabetes Mellitus. *Type 1 Diabetes - Complications, Pathogenesis, and Alternative Treatments*. Doi: 10.5772/22765
Weber, M., Deng, S., Kucher, T., Shaked, A., Ketchum, R. and Brayman, K., 1997. Adenoviral Transfection of Isolated Pancreatic Islets: A Study of Programmed Cell Death (Apoptosis) and Islet Function. *Journal of Surgical Research*, 69(1), pp.23-32. doi: 10.1006/jsre.1997.4995

Zhou, Y., Pena, J., Roe, M., Mittal, A., Levisetti, M., Baldwin, A., Pugh, W., Ostrega, D., Ahmed, N., Bindokas, V., Philipson, L., Hanahan, D., Thompson, C. and Polonsky, K., 2000. Overexpression of Bcl-xL in β -cells prevents cell death but impairs mitochondrial signal for insulin secretion. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 278(2), pp. E340-E351. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.2000.278.2.E340>

Anexo I

Tabla 1. Composición del medio completo para INS-1E.

Compuesto	Concentración
Na Piruvato (Gibco)	1 mM
HEPES (Gibco)	10 mM
Estreptomicina (Gibco)	100 µg/mL
Penicilina (Gibco)	100 U/mL
FBS (Hyclone)	5%
β-2-Mercaptoetanol (Gibco)	50 µM
Medio RPMI 1640 con Glutamax (Gibco)	-

Tabla 2. Composición del medio de infección para EndoC-βH1.

Compuesto	Concentración
Transferrina Humana (Sigma)	5.5 µg/mL
Na ₂ SeO ₃ (Sigma)	6.7 ng/mL
Nicotinamida (Sigma)	10 mM
β-2-Mercaptoetanol (Gibco)	50 µM
FBS (Hyclone)	2%
Medio DMEM 1x (Gibco)	-

Tabla 3. Composición del medio Ringer-Krebs para perfusión (pH 7.37 con NaOH).

Compuesto	Concentración (mM)
NaCl (Panreac)	141
KCl (Panreac)	5.5
MgCl ₂ ·6H ₂ O (Panreac)	1
CaCl ₂ ·2H ₂ O (Merck)	2
HEPES 1M pH 7.4 (Sigma)	20
Agua destilada	-

Tabla 4. Composición del Tampón de Bloqueo para ICF.

Compuesto	Concentración (w/v)
BSA	5%
Suero cabra (Capricorn Scientific)	10%
PBS(Biowest)	-

El PBS debe ser previamente filtrado con un filtro de tamaño de poro 0.2 µm.

Tabla 5. Composición del medio Krebs para secreción.

Compuesto	Concentración (mM)
NaCl (Panreac)	120
KCl (Panreac)	3.5
NaHCO ₃ (Panreac)	5
NaH ₂ PO ₄ (Panreac)	0.5
MgCl ₂ (Panreac)	0.5
CaCl ₂ ·2H ₂ O (MERCK)	1.5
HEPES 1M pH 7.4 (Sigma)	10
BSA fracción V	0.1% (w/v)
H ₂ O MiliQ	-

Tabla 6. Composición del Tampón de Lisis.

El tampón de lisis utilizado se compone de medio TETG con anti-proteasa *Complete* (Roche). La composición del Medio TETG es la siguiente:

Compuesto	Concentración
Tris pH 8.0 (Sigma)	20 mM
Triton X-100 (MERCK)	1%
Glicerol (Rectapur)	10 %
NaCl	137 mM
EGTA (Sigma)	2 mM
H ₂ O	-

Tabla 7. Composición del Tampón de Carga 5x (pH 6.8).

Compuesto	Concentración
Glicerol	10%
DTT (AppliChem)	0.1 M
Tris pH 8.0	62.5 mM
SDS (Panreac)	2 %
Bromofenol azul (Biorad)	0.2 mg/mL
β-2-Mercaptoetanol (Gibco)	2 %
H ₂ O	-

Tabla 8. Composición del medio TBS-T.

Compuesto	Volumen
Tris pH 8.0 1 M (Sigma)	10 mM
NaCl	15 mM
Tween 20 (Sigma)	0.05 %
H ₂ O	-