

Evaluación del silenciamiento del receptor de estrógenos beta sobre la expresión génica de marcadores de identidad de célula-beta en la línea celular INS1-E

Autora: María Asunción Moreno Quiles

Tutor: Ángel Nadal Navajas

Cotutora: Marina Serrano Maciá

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA

Instituto de Investigación en Biotecnología y Salud

Índice

Evaluación del silenciamiento del receptor de estrógenos beta sobre la expresión génica de marcadores de identidad de célula-beta en la línea celular INS1-E	1
Resumen	3
Abreviatura	4
1. Introducción.....	5
Diabetes: definición y epidemiología	5
Características de la célula-beta pancreática	6
Fisiología de la célula-beta pancreática.....	6
Glucotoxicidad y estrés celular en la célula-β.....	8
Estrógenos y sus receptores.....	9
ERβ: regulación de la expresión génica y estructura proteica.....	11
ERβ: funciones y mecanismos de señalización	12
2. Antecedentes y objetivos	13
3. Materiales y métodos	14
Cultivo celular de la línea INS-1E	14
Diseño experimental.....	17
Extracción proteica, cuantificación y Western Blot	19
Aislamiento, cuantificación y retrotranscripción de ARN.....	21
Análisis de expresión génica mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)	22
Análisis estadístico	23
4. Resultados	24
Validación de anticuerpos para la óptima detección de ERβ mediante técnicas inmunológicas.....	24
Optimización y validación de la ventana temporal óptima para el silenciamiento de ERβ.....	25
Validación del silenciamiento de ERβ mediante RT-qPCR.....	27
Análisis de expresión de marcadores de identidad de la célula-β pancreática....	28
Evaluación de marcadores de glucotoxicidad	30
5. Discusión	32
6. Conclusiones y proyección futura.....	37
7. Bibliografía	38

Resumen

La diabetes mellitus se caracteriza por la pérdida progresiva de la masa y funcionalidad de las células- β pancreáticas. Entre los factores implicados en su mantenimiento destaca el receptor de estrógenos β (ER β), aunque su papel específico en la identidad celular y en la respuesta a la glucotoxicidad aún no se conoce completamente. El objetivo de este trabajo fue establecer un protocolo eficaz de silenciamiento de *Esr2*, gen que codifica la proteína del receptor de estrógenos ER β , mediante siRNA en células INS-1E y analizar las consecuencias de la ausencia de ER β sobre marcadores de identidad de la célula- β y de estrés de retículo endoplásmico. Los resultados mostraron que el protocolo de doble transfección redujo la expresión de *Esr2* aproximadamente un 50 %. La pérdida de ER β indujo un aumento en la expresión de los genes *Mafa* y *Pdx1*, mientras que *Nkx6.1* no mostró cambios significativos. Por el contrario, la expresión de *Ins1* disminuyó tras el silenciamiento del receptor. Respecto al estrés de retículo endoplásmico, no se observaron cambios en la expresión de los marcadores *Hspa5* (BiP) y *Ddit3* (CHOP) tras la exposición a 25 mM de glucosa durante 6 horas.

En conjunto, estos resultados sugieren que ER β podría participar en el mantenimiento de la identidad de la célula β pancreática.

Palabras clave: Célula- β pancreática, INS-1E, Receptor de estrógenos beta (ER β), *Esr2*, Silenciamiento génico, siRNA, Glucotoxicidad.

Abstract: Diabetes mellitus is characterized by the progressive loss of pancreatic β -cell mass and function. Among the factors involved in their maintenance, the estrogen receptor β (ER β) stands out, although its specific role in cell identity and the response to glucotoxicity is not yet fully understood. The aim of this study was to establish an effective siRNA silencing protocol for *Esr2* in INS-1E cells and to analyze the consequences of ER β absence on β -cell identity markers and endoplasmic reticulum stress. The results showed that the double transfection protocol reduced *Esr2* expression by approximately 50%. ER β loss induced an increase in the expression of the *Mafa* and *Pdx1* genes, while *Nkx6.1* showed no significant changes. Conversely, *Ins1* expression decreased after receptor silencing. Regarding endoplasmic reticulum stress, no changes were observed in the expression of the *Hspa5* (BiP) and *Ddit3* (CHOP) markers after exposure to 25 mM glucose for 6 hours. Taken together, these results suggest that ER β is involved in maintaining pancreatic β -cell identity and highlight the complexity of the mechanisms that regulate gene expression in these cells.

Keywords: Pancreatic β cell, INS-1E, Estrogen receptor beta (ER β) *Esr2*, Gene silencing, siRNA, Glucotoxicity.

Abreviatura

ADNc: ADN complementario

AF-1: *Activation Function-1* (Función de activación 1)

AF-2: *Activation Function-2* (Función de activación 2) ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

Akt: *Protein Kinase B* (PKB) (Proteína quinasa B)

AMPK: *AMP-Activated Protein Kinase* (Proteína quinasa activada por AMP)

AP-1: *Activator Protein 1* (Proteína activadora 1)

ARNm: ARN mensajero

AS160: *Akt Substrate of 160 kDa* (Sustrato de Akt de 160 kDa; también denominada TBC1D4)

CpG: *Cytosine-phosphate-Guanine* (Dinucleótido citosina-fosfato-guanina)

E2: 17 β -estradiol

ER: receptores de estrógenos

ERE: elementos de respuesta a estrógenos

ER α : receptor de estrógenos alpha

ER β : receptor de estrógenos beta

G: glucosa

GCK: glucoquinasa

GLUT: *Glucose Transporter Type 4* (Transportador de glucosa tipo 4)

GPB/GPR30: receptor de estrógeno acoplado a proteína G

IRS: *Insulin Receptor Substrate* (Sustrato del receptor de insulina)

KATP: canales de K⁺ dependientes de ATP

LBD: *ligand binding domains* (dominio de unión al ligando)

LDH: lactato deshidrogenasa

MAPK: *Mitogen-Activated Protein Kinase* (Proteína quinasa activada por mitógenos)

MCT1: transportador de monocarboxilatos

NH₂: Grupo amino terminal o extremo amino de la proteína (N-terminus amino group)

NR: receptores nucleares

PDK-1: *3-Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase 1* (Proteína quinasa dependiente de fosfoinosítidos 1)

PI3K: *Phosphoinositide 3-Kinase* (Fosfatidilinositol 3-quinasa)

PIP3: *Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate* (Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato)

PKC: *Protein Kinase C* (Proteína quinasa C)

Rab: *Ras-related proteins in brain* (Familia de proteínas Rab implicadas en el tráfico vesicular)

Ras: *Rat Sarcoma* (familia de pequeñas proteínas GTPasas Ras)

RISC: *RNA-induced silencing complex* (complejo de silenciamiento mediante ARN)

Shc: *Src Homology 2 Domain Containing Transforming Protein* (Proteína transformadora que contiene un dominio SH2)

siCtrl: siRNA control

siER β : siRNA específico frente a *Esr2*

siRNA: ARN de interferencia

SNARE: *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment Protein Receptor* (Receptor de proteínas de unión al factor sensible a N-etilmaleimida soluble)

Sp1: *Specificity Protein 1* (Proteína de especificidad 1)

UPR: *Unfolded Protein Response* (Respuesta a proteínas mal plegadas)

1. Introducción

Diabetes: definición y epidemiología

La diabetes es una enfermedad crónica que engloba un conjunto de trastornos metabólicos caracterizados por la presencia de hiperglucemia crónica, es decir, una elevación sostenida de glucosa en sangre. Esta alteración de la homeostasis de la glucosa puede producirse como consecuencia de defectos en la secreción de insulina, resistencia periférica a su acción o ambos procesos simultáneamente [1].

La insulina es una hormona producida y secretada por las células-beta del páncreas y constituye la única hormona con efecto hipoglucemiantes directo en el organismo [2]. Su función principal es promover la captación y utilización de la glucosa por los tejidos periféricos, contribuyendo al mantenimiento de la homeostasis energética [2].

La diabetes mellitus se clasifica principalmente en diabetes tipo 1 (DM1) y diabetes tipo 2 (DM2). La DM1 es considerada una enfermedad autoinmune caracterizada por una destrucción de las células-beta pancreáticas por parte del sistema inmunitario causando una producción deficiente de insulina [1,2]. Por otro lado, la DM2, es la forma más frecuente de la enfermedad que constituye entre 90-95% de los casos de diabetes y se caracteriza por la resistencia a la insulina en los tejidos periféricos y una incapacidad progresiva de las células-beta para compensar dicha resistencia [3]. Se han asociado factores de riesgo para el desarrollo de la DM2 como son los factores genéticos y ambientales, donde destacan la obesidad y el sedentarismo [2].

El daño glucotóxico prolongado compromete la viabilidad y capacidad secretora de la célula-beta pancreática. A nivel sistémico, esta disfunción metabólica crónica desencadena complicaciones micro y macrovasculares que afectan de manera selectiva a los sistemas cardiovascular, nervioso, renal y visual [3].

La diabetes mellitus constituye uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial. Según instituciones como la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Federación Internacional de Diabetes (FID), se confirma que su prevalencia ha aumentado de forma considerable en los últimos años, y actualmente provoca más de 3.4 millones de fallecimientos anuales a nivel mundial [4]. Además, se estima que para 2050 la enfermedad alcance una prevalencia global del 13% en adultos (20-79 años), lo que equivaldrá a unos 853 millones de personas afectadas [4]. Este incremento se ha asociado al envejecimiento poblacional y al aumento de factores de riesgo metabólicos como la obesidad y el sedentarismo [4].

Por lo tanto, dadas las cifras comentadas, el interés científico por comprender al máximo la fisiopatología de la enfermedad cobra mucha importancia, así como la prevención, el

diagnóstico precoz y el desarrollo de estrategias terapéuticas eficaces para reducir su impacto sanitario.

Características de la célula-beta pancreática

Las células- β son células endocrinas especializadas en la secreción de insulina que se encuentran en los islotes de Langerhans localizados en el páncreas. Los islotes de Langerhans están formados por cinco tipos celulares, las células- α (productoras de glucagón), las células- δ (productoras de somatostatina), células- γ o PP (productoras de polipéptidos pancreáticos), las células- ϵ (productoras de ghrelina) y, finalmente, las células- β , objeto de nuestro trabajo [5]. Estas últimas, representan alrededor del 60% de la masa de los islotes de Langerhans en humanos (entre el 70% y el 80% en ratón), por lo que es el tipo celular más abundante y, en consecuencia, el más estudiado [5]. Estas células tienen un citoplasma rico en gránulos de secreción densos, un núcleo redondeado y numerosas mitocondrias que soportan su metabolismo interno. Están rodeadas por capilares fenestrados que permiten el rápido intercambio de moléculas con la sangre, y establecen conexiones paracrinas con células α , δ y PP de los islotes. Su organización y polaridad celular facilitan la comunicación con el entorno vascular y con otras células del islote, lo que es fundamental para mantener la homeostasis del tejido pancreático [5, 6].

El metabolismo de la glucosa en las células- β pancreáticas presenta características particulares en comparación con otros tipos celulares. Estas células expresan transportadores de glucosa con baja afinidad, pero alta capacidad de transporte, principalmente GLUT1 y GLUT2 en humanos y GLUT2 en ratón. Estos transportadores son independientes de insulina, a diferencia de otros transportadores de glucosa como GLUT4 presente en tejido adiposo y músculo esquelético, lo que permite que la entrada de glucosa dependa directamente de su concentración en el medio. Además, la presencia de la enzima glucoquinasa (GCK), una hexoquinasa de baja afinidad, hace que la tasa de metabolismo de la glucosa esté fundamentalmente determinada por la disponibilidad del propio sustrato, puesto que, a diferencia de las hexoquinasas en otros tejidos, la glucoquinasa pancreática no es inhibida por la acumulación del producto de la reacción [7].

Fisiología de la célula-beta pancreática

El proceso de síntesis de insulina se inicia en los ribosomas del retículo endoplásmico (RE) con la traducción de la preproinsulina, la cual contiene un péptido señal N-terminal que dirige su translocación hacia el lumen del RE a través de factores como SEC62. Tras la eliminación de este péptido señal por peptidasas, la molécula resultante, la proinsulina, experimenta un plegamiento tridimensional crítico estabilizado por la formación de tres puentes disulfuro

esenciales. Después, la proinsulina correctamente plegada se transporta al aparato de Golgi y se empaqueta en gránulos de secreción; en el interior de estas vesículas, la progresiva acidificación del medio activa a las endopeptidasas PC1/3 y PC2, junto con la carboxipeptidasa E, las cuales escinden covalentemente el péptido C, generando finalmente la molécula de insulina madura y funcional lista para su posterior exocitosis.

La secreción de insulina comienza cuando la glucosa entra rápidamente en la célula a través de los transportadores GLUT2. Una vez en el citosol, la glucosa es fosforilada por la glucoquinasa. La glucosa-6-fosfato resultante entra en la glucólisis, generando piruvato que se oxida en la mitocondria mediante el ciclo de Krebs. La transferencia de electrones en la cadena respiratoria genera un aumento drástico de la relación ATP/ADP (Figura 1). Este incremento de energía provoca el cierre de los canales de K^+ dependientes de ATP (K_{ATP}), formados por las subunidades Kir6.2 y SUR1. Al detenerse la salida de potasio, la membrana se despolariza, alcanzando un umbral que dispara la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje (tipo L). El flujo masivo de Ca^{2+} hace que este ion se una de forma específica a la proteína sinaptotagmina, presenta en la membrana externa de las vesículas que contiene insulina, induciendo un cambio conformacional en las mismas que les permite unir a la syntaxina, proteína presente en la membrana plasmática interna permitiendo la fusión de las membranas, exocitosis y secreción de la insulina (Figura 1) [7,8, 9].

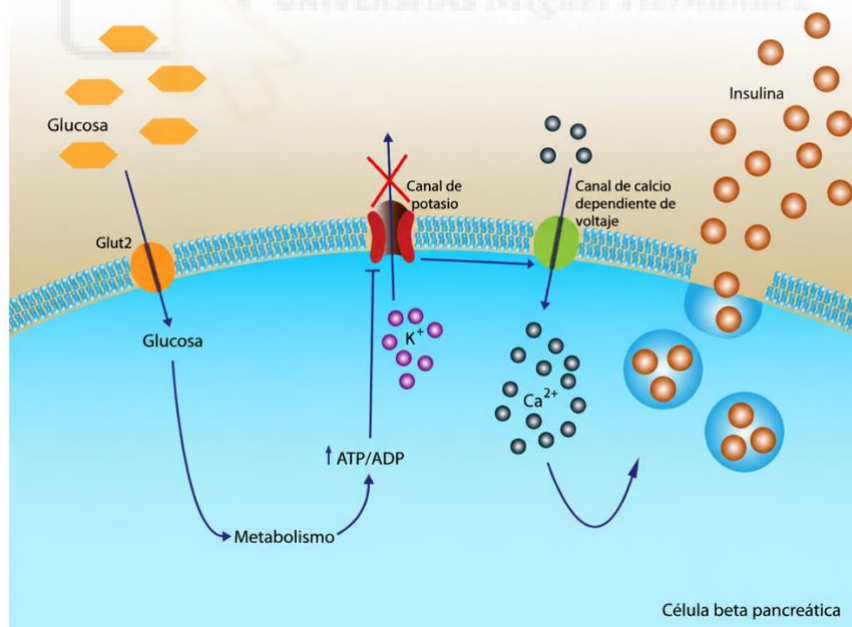


Figura 1. Mecanismo molecular de la Secreción de Insulina Estimulada por Glucosa (GSIS). Adaptación de Hepley et al. (2024), A Receptor Story: Insulin Resistance Pathophysiology and Physiologic Insulin Resensitization's Role as a Treatment Modality, *International Journal of Molecular Sciences*. K^+ : ion potasio; Ca^{2+} : ion calcio; GLUT2: transportador de glucosa tipo 2; ATP: adenosín trifosfato; ADP: adenosín difosfato.

La insulina liberada se unirá posteriormente a sus receptores específicos en las células de los tejidos sensibles a la misma.

Identidad y mantenimiento de la célula-β

El mantenimiento de la identidad de la célula-beta depende de una regulación coordinada de múltiples factores de transcripción y genes específicos que mantienen su diferenciación y capacidad secretora [8]. Entre los principales genes implicados en la identidad y funcionalidad de la célula-β pancreática destacan: Homeobox pancreático y duodenal 1 (*Pdx1*), Factor de transcripción MAF de cremallera de leucinas A (*Mafa*), caja homeótica NK6.1 (*Nkx6.1*) e Insulina 1 (*Ins1*).

Pdx1 es un factor de transcripción que activa de forma directa el gen de la insulina (*Ins1*), responsable de la síntesis de insulina. De esta forma, *Pdx1* regula la respuesta a la glucosa por parte de la célula-β pancreática. Además, también está implicado en la organogénesis pancreática durante la embriogénesis y regula la expresión otras hormonas en el páncreas, como la somatostatina, la glucoquinasa, el transportador de glucosa tipo 1/3 (Glut1/3) y el polipéptido amiloide de los islotes [10, 11]. *Mafa*, actúa como un factor de transcripción implicado en potenciar la síntesis de insulina. Se expresa principalmente, en las células-β pancreáticas maduras, representando el marcador que mejor indica que la célula es madura y funcional. Ambos, *Pdx1* y *Mafa* actúan de forma coordinada para unirse directamente al promotor del gen de la insulina, asociándose *Mafa* físicamente a *Pdx1*. Estas proteínas forman complejos transcripcionales con otras proteínas accesorias en las regiones reguladoras del ADN. Si uno de ellos falla o sufre alteraciones en su regulación, la transcripción del gen de la insulina se ve severamente comprometida, ya que son indispensables para activar la maquinaria de transcripción [11]. A diferencia de los factores transcripcionales descritos anteriormente, *Nkx6.1* no regula de forma directa el gen de la insulina, sino que ejerce un control indirecto sobre su producción. Este homodominio es indispensable para el desarrollo embrionario del epitelio pancreático y la especificación hacia el linaje de las células-β. Asimismo, participa en la homeostasis celular mediante la regulación directa de la expresión de transportadores de glucosa como GLUT2, la piruvato carboxilasa (*Pcx*) y genes para el procesamiento de la insulina [11,12].

Glucotoxicidad y estrés celular en la célula-β

La glucotoxicidad hace referencia a las elevaciones de glucosa sostenida en el tiempo. Estas condiciones favorecen la alteración de la expresión de genes clave de identidad y la activación de respuestas de estrés celular, especialmente estrés de retículo endoplasmático. Esto provoca que factores como *Pdx1*, *Mafa* y *Nkx6.1* disminuyan de forma progresiva, lo que altera la

producción de insulina y hace que las células pierdan su funcionalidad. Al final, este declive es un factor clave en el deterioro constante de la masa y la función de las células- β pancreáticas que vemos en la diabetes tipo 2 [13].

El exceso de glucosa aumenta la carga del retículo endoplasmático puesto que induce una síntesis excesiva de insulina y otras proteínas implicadas en su secreción. Esto desemboca en la formación de proteínas mal plegadas activando una respuesta adaptativa cuyo objetivo inicial es restaurar la homeostasis celular [14]. Entre los principales marcadores moleculares de estrés de retículo destacan la Proteína de Unión a Inmunoglobulinas (BiP) y la Proteína Homóloga a C/EBP (CHOP). BiP es una chaperona molecular localizada en el retículo endoplasmático. Su función principal consiste en facilitar el correcto plegamiento de proteínas y evitar la acumulación de proteínas mal conformadas teniendo un efecto protector [15]. Por ello, el aumento de expresión del miembro 5 de la Familia A de Proteínas de Choque Térmico (*Hspa5*), gen responsable de la síntesis de BiP, se considera uno de los primeros indicadores de activación del estrés de retículo endoplasmático [15]. Por el contrario, CHOP se asocia principalmente con respuestas proapoptóticas [15]. Esta proteína está codificada por el “Transcrito 3 Inducible por Daño” al ADN (*Ddit3*) y el aumento de su expresión favorece mecanismos de muerte celular desembocando en la pérdida de funcionalidad y disminución de la masa de células- β que conducen a la diabetes tipo 2 [15, 16].

Estrógenos y sus receptores

Los estrógenos son un grupo de hormonas esteroideas responsables del desarrollo y mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios femeninos y de la regulación del ciclo reproductivo. Además, participan en la modulación de diversos procesos fisiológicos, incluyendo el metabolismo óseo, cardiovascular y energético [17]. Derivan del ciclopentanoperhidrofenantreno y son moléculas liposolubles capaces de atravesar la membrana celular. Los estrógenos se forman a partir de precursores androgénicos y se sintetizan principalmente en los ovarios, y en menor medida en las glándulas suprarrenales, el tejido adiposo, el cerebro y los testículos [18, 19]. El 17β -estradiol es el principal estrógeno circulante en mujeres premenopáusicas [20].

Los receptores de estrógenos (ER) pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares (NR), la cual se divide en seis subfamilias. Dentro de la subfamilia 3, se encuentran además de los receptores de estrógenos (ER α , ER β), también los receptores de andrógenos, progesterona, mineralocorticoides y estrógenos acoplados a membrana [21]. Con respecto a la diabetes, la protección frente a esta enfermedad que se observa en las mujeres sugirió un posible efecto mediado por estrógenos, puesto que son las principales hormonas femeninas. Esta hipótesis se

reforzó con la observación de la pérdida de dicha protección en mujeres postmenopáusicas, momento donde los niveles de estas hormonas caen drásticamente [22, 23]. Estudios posteriores demostraron que la menor incidencia de la diabetes en población femenina puede atribuirse en parte a la acción del 17 β -estradiol (E2) a través de su unión a tres receptores de estrógeno: los receptores de estrógeno α (ER α) y β (ER β) [6, 21] y el receptor de estrógeno acoplado a proteína G (GPER/GPR30) [24]. Los receptores de estrógenos presentan una amplia distribución tisular y se han identificado en numerosos órganos, incluyendo tejidos reproductivos, cerebro, sistema cardiovascular, hígado, músculo esquelético, tejido adiposo y páncreas, donde participan en la regulación de múltiples procesos fisiológicos y metabólicos [25, 26, 27, 28, 29].

Los receptores de estrógenos ER α y ER β desempeñan funciones diferenciadas en la regulación de la actividad de las células- β pancreáticas mediada por E2 [21]. Mientras que ER α está implicado directamente en la regulación de la síntesis de insulina, ER β contribuye a potenciar la liberación de insulina estimulada por glucosa en presencia de E2 [30]. Ambos receptores ejercen estos efectos dentro de los niveles fisiológicos de estradiol. Además, GPER1/GPR30 también parece intervenir en la regulación del acoplamiento estímulo-secreción mediado por E2 en los distintos tipos celulares presentes en los islotes pancreáticos [30].

El mecanismo clásico o genómico de acción de ER se desarrolla generalmente a lo largo de varias horas y culmina con la activación o represión de genes específicos. En esta vía, tras la unión del ligando, el receptor se libera de las proteínas chaperonas de choque térmico con las que se encuentra asociado en estado inactivo. Una vez activado, el ER forma dímeros que pueden unirse directamente a los elementos de respuesta a estrógenos (ERE) presentes en las regiones promotoras de los genes diana [19, 20]. Alternativamente, el receptor también puede modular la transcripción de forma indirecta mediante la interacción con otros factores de transcripción, como AP-1 o Sp1, que ya están asociados al ADN [21]. Tras esta unión, los dímeros de ER reclutan diferentes correguladores, ya sean coactivadores o correpresores, que modulan finalmente el nivel de expresión génica. Aunque muchas de las funciones reproductivas de los estrógenos dependen del receptor de estrógenos nuclear clásico, que actúa como un factor de transcripción activado por ligando, numerosas acciones relacionadas con el metabolismo energético implican también la participación de receptores localizados fuera del núcleo [21]. Estos receptores extranucleares pueden influir en la expresión génica de manera indirecta o incluso desencadenar respuestas celulares independientes de los mecanismos nucleares tradicionales. En este contexto, el E2 es capaz de iniciar señales rápidas, que se producen en escalas de tiempo de segundos a minutos, a través de formas de ER asociadas a la membrana celular o localizadas en compartimentos extranucleares [20].

Cuando la demanda de producción de insulina se mantiene elevada durante periodos prolongados como consecuencia, por ejemplo, de una resistencia a dicha insulina, las células- β pueden experimentar estrés celular que conduce a apoptosis. En este contexto, ER α , ER β y GPER1/GPR30 contribuyen a proteger a estas células frente a la muerte celular, ayudando a preservar la masa funcional de células- β [21,24]. En conjunto, estos receptores de estrógenos podrían desempeñar un papel clave en los mecanismos adaptativos del páncreas durante situaciones de resistencia a la insulina [30].

ER β : regulación de la expresión génica y estructura proteica

Hasta 1995 se creyó que solo existía un receptor de estrógenos mediador de todos los efectos de estrógenos y antiestrógenos. Sin embargo, ese mismo año se clonó un segundo receptor a partir de ADNc de próstata de rata, al que se le llamó ER β , pasando el receptor previamente descrito a denominarse ER α . A partir de ese año, se han descrito varias variantes de ajuste de ER β que se han podido relacionar con las 5 isoformas clonadas de ER β : ER β 1 hasta Er β 5.

El gen que codifica para la proteína ER β humana se llamó *Esr2* y la proteína está compuesta por tres dominios funcionales independientes pero interactivos: el dominio N2-terminal o A/B, el dominio C o de unión al ADN, y el dominio D/E/F o de unión al ligando (Figura 2). El dominio A/B en el extremo NH₂ contiene el sitio AF-1, donde interactúan otros factores de transcripción (Figura 2). El dominio C/D contiene la estructura de dos dedos de zinc que se une al ADN, y el dominio C/F contiene el bolsillo de unión al ligando, así como el dominio AF-2, que contacta directamente con los péptidos coactivadores (Figura 2) [31].

La falta de especificidad en los anticuerpos comerciales para ER β es uno de los mayores desafíos metodológicos al usar Western blot, inmunohistoquímica o inmunofluorescencia. Esta limitación pone en entredicho parte de la literatura científica actual, donde es muy factible que se hayan interpretado bandas inespecíficas como si fueran el propio receptor [32]. La presencia de diversas isoformas y de proteínas con pesos moleculares parecidos complica aún más las técnicas inmunológicas. El resultado es una enorme variabilidad en los patrones de detección y el riesgo constante de que distintos anticuerpos reconozcan proteínas no relacionadas. Diversos estudios han comprobado que varios de los anticuerpos más utilizados fallaban en especificidad e incluso detectaban proteínas inespecíficas. La confusión y las contradicciones que inundan la literatura sobre la expresión y función de ER β nacen del uso generalizado de reactivos mal validados [32].

La regulación de la expresión génica del receptor de estrógenos beta es un proceso complejo coordinado a nivel transcripcional, epigenético y postranscripcional. La transcripción de *Esr2* está dirigida por el uso de promotores alternativos (principalmente OK, ON y 1B), los cuales

muestran una fuerte especificidad tisular y responden a estímulos hormonales y metabólicos [33]. Mecanismos epigenéticos, tales como la hipermetilación de las islas CpGs en dichos promotores y la desacetilación de histonas, actúan como potentes represores de su expresión, un fenómeno ampliamente descrito en contextos de resistencia hormonal y progresión tumoral [34]. Asimismo, la estabilidad del ARNm de *Esr2* se encuentra bajo un estricto control postranscripcional mediado por microARNs específicos (como miR-17). En entornos metabólicamente estresantes, como la glucotoxicidad, alteraciones en estas redes epigenéticas y de microARNs pueden inducir la pérdida o desregulación de ER β , comprometiendo la homeostasis y supervivencia celular [35].

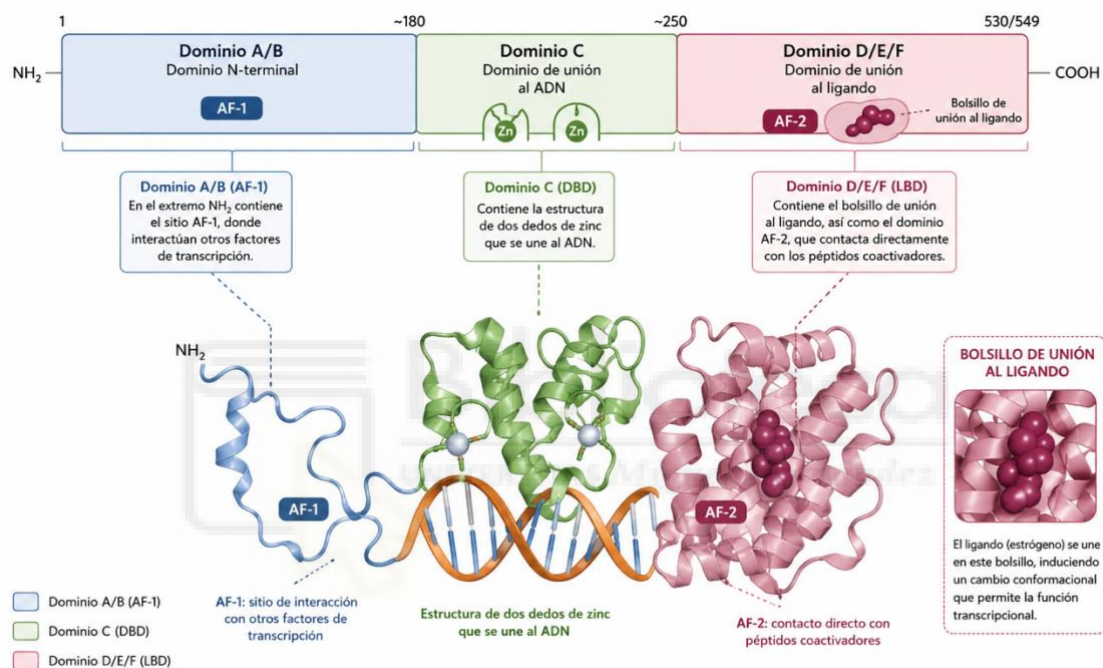


Figura 2. Estructura modular y dominios funcionales del Receptor de Estrógenos β (ER β) humano. Esquema representativo de la organización lineal de los aminoácidos y la conformación tridimensional de los dominios del receptor ER β . Se detallan el Dominio A/B (N-terminal) con la función de activación transactivadora independiente de ligando (AF-1); el Dominio C (DBD), encargado de la unión específica al ADN mediante estructuras de "dedos de zinc"; y el Dominio D/E/F (C-terminal), que alberga el bolsillo de unión al ligando (LBD) y la región AF-2 de interacción con coactivadores transcripcionales. *Figura generada mediante asistencia de Inteligencia Artificial (ChatGPT, OpenAI).*

ER β : funciones y mecanismos de señalización

ER β actúa principalmente como un factor de transcripción dependiente de ligando. Tras la unión del estrógeno al dominio de unión al ligando (LBD), el receptor experimenta cambios conformacionales que favorecen su dimerización y posterior unión a secuencias específicas del ADN denominadas elementos de respuesta a estrógenos (EREs). Esta interacción permite regular la transcripción de genes implicados en proliferación, diferenciación, metabolismo y supervivencia celular.

Además de su acción genómica clásica, ER β también puede activar vías de señalización no genómicas mediante interacciones rápidas con proteínas citoplasmáticas y quinasas intracelulares. Entre las principales rutas moduladas por ER β destacan MAPK/ERK, PI3K/Akt y AMPK, las cuales participan en procesos relacionados con supervivencia celular, metabolismo energético y respuesta al estrés oxidativo [36, 37].

En las células- β pancreáticas, ER β se ha relacionado con mecanismos de protección celular y regulación de la secreción de insulina. Diversos estudios sugieren que la activación de este receptor contribuye al mantenimiento de la funcionalidad de la célula- β y a la adaptación frente a condiciones de estrés metabólico [38].

2. Antecedentes y objetivos

Diversos estudios han mostrado que el 17 β -estradiol puede potenciar la secreción de insulina inducida por glucosa en los islotes pancreáticos de Langerhans, efecto que se produce mediante la activación de receptores de estrógenos: ER α y ER β [22]. Aunque diversos estudios han descrito efectos protectores de ER β frente al estrés metabólico, estrés oxidativo y disfunción secretora, el papel específico de ER β en el mantenimiento de la identidad y funcionalidad de la célula- β pancreática todavía no se conoce completamente.

Con tal de esclarecer la función de ER β en la célula-beta pancreática el objetivo del presente trabajo final de grado es evaluar el impacto del silenciamiento génico de ER β sobre el perfil de expresión de los genes marcadores de identidad en un modelo celular de célula- β pancreática, tanto en condiciones basales como bajo un estímulo de estrés glucotóxico.

Con este fin, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Validar la eficiencia y la ventana temporal de funcionalidad del silenciamiento de ER β mediante la técnica de Western Blot en células INS-1E.
- Analizar, mediante RT-qPCR, la expresión de los genes clave de identidad celular (*Pdx1*, *Mafa*, *Nkx6.1* e *Ins1*) en condiciones de glucosa basal tras el silenciamiento de ER β .
- Evaluar el impacto de la exposición a un ambiente hiperglucémico (25 mM de glucosa durante 6 horas) sobre la inducción de glucotoxicidad en el modelo celular.
- Determinar si la ausencia de ER β modifica la respuesta de estrés del retículo endoplásmico analizando la expresión de los marcadores moleculares *Hspa5* y *Ddit3*.

3. Materiales y métodos

Cultivo celular de la línea INS-1E

Para estudiar las funciones y mecanismos de acción de ER β en la fisiología de la célula- β pancreática es frecuente el uso de la línea celular INS-1E, una línea inmortalizada de células- β pancreáticas de rata. Esta línea celular constituye un clon derivado de la línea original INS-1, obtenida a partir de un insulinoma de rata inducido mediante irradiación con rayos X. Las células INS-1E conservan características funcionales propias de las células- β pancreáticas, incluyendo la capacidad de sintetizar y secretar insulina en respuesta a cambios en la concentración de glucosa. Presentan un crecimiento lento, con un tiempo de duplicación de unas 100 horas aproximadamente, y retienen características morfológicas típicas de las células- β nativas. La mayoría se tiñe positivamente para la insulina y no reacciona ante otras hormonas de los islotes pancreáticos [39, 40].

Las células se cultivaron en medio completo *Roswell Park Memorial Institute* 1640 (RPMI-1640, Ref.), cuya concentración de glucosa es de 11 mM, suplementado con GlutaMAX™ (Gibco, 61870-010), suero fetal bovino (FBS) inactivado al 5% (CYTIVA, SV30160.03), HEPES 1 M (Gibco, 15630-056), piruvato sódico 100 mM (Gibco, 11360-039), β -mercaptoetanol (β -ME) 50 mM (Gibco, 31350-010) y penicilina-estreptomicina (10000 U/mL; Gibco, 15140-122). El cultivo celular se mantuvo a 37 °C en una atmósfera con un 5% de CO₂ y condiciones controladas de humedad.

El mantenimiento celular se realizó en frascos de cultivo de 25 cm² hasta alcanzar una confluencia aproximada del 70–80%, momento en el cual se efectuó el pase celular. Para ello, las células se lavaron con 5 ml de PBS estéril sin calcio ni magnesio (Corning, 21-040-CV) y posteriormente se disgregaron mediante incubación con tripsina-EDTA al 0,05% (Gibco, 25300-054) durante 5 minutos a 37 °C en una atmósfera con un 5% de CO₂ y condiciones controladas de humedad. La acción de la tripsina se neutralizó añadiendo 4'5 ml de medio completo y la suspensión celular se transfirió entonces a tubos Falcon de 15 mL. Las células se centrifugaron a 1000 rpms, a 20 °C y durante 7 minutos. Se descartó el sobrenadante y el pellet celular se resuspendió en 1 mL de medio de cultivo completo. A esta suspensión se le añadió posteriormente otros 5 ml de medio de cultivo completo, obteniendo un volumen final de 6 ml de suspensión celular en el tubo falcon.

La concentración celular se determinó mediante recuento en cámara de Neubauer utilizando un microscopio óptico (Nikon, ECLIPSE TS100) Para ello, se hizo una dilución 1:3 de la suspensión de células obtenidas tras la centrifugación. A continuación, se tomaron 10 μ L de suspensión celular diluida, que se introdujeron en la cámara y se contabilizaron las células presentes en los

cuatro cuadrantes principales de la cámara. El número de células por mililitro se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Número de células / mL} = \frac{\text{número de células contadas en los 4 cuadrantes}}{4} \times 10000 \times 3 \text{ (factor de dilución)}$$

Finalmente, las células se sembraron a una densidad de $1,5 \times 10^6$ células/mL en frascos de 25 cm² para el mantenimiento rutinario del cultivo de células y a una densidad de 100.000 células por pocillo en placas de 24 pocillos para la realización de los experimentos. El pase de células y la siembra se realizó una vez a la semana (viernes) mientras que los cambios de medio necesarios para el mantenimiento celular se realizaron pasados 4 días desde el pase (martes).

Protocolo de silenciamiento de ERβ

El estudio de la función y relevancia en la célula-beta pancreática del receptor ERβ se realizó mediante el bloqueo postranscripcional del gen *Esr2*.

Para establecer el protocolo de silenciamiento génico mediante siRNA nos guiamos de las indicaciones descritas previamente para la transfección y silenciamiento de *Esr2* mediante siRNA en células INS-1E [41] con ligeras modificaciones adaptadas a las condiciones experimentales del presente estudio, como fue la determinación del tiempo post-transfección necesario para optimizar el silenciamiento génico o la decisión de emplear un doble silenciamiento para asegurar la eficacia del proceso.

Se procedió a la transfección utilizando siRNA específico frente a *Esr2* comercial (ESR2_RAT - Qiagen GeneGlobe - SICOO58646; Lot:678762741) y un siRNA control no dirigido (Qiagen GeneGlobe - FlexiTube siRNA AllStars SIO3650318; Lot:628554517) a modo de control negativo que resulta fundamental para confirmar que cualquier cambio fenotípico detectado es consecuencia directa del silenciamiento de *Esr2* y no de una respuesta inespecífica de la célula a la transfección. Para facilitar la entrada de los siRNA en las células, se utilizó el reactivo Lipofectamine RNAiMAX (INVITROGEN 13778075; Lot: 3036124), el cual actúa mediante la formación de complejos lipídicos que facilitan la endocitosis del siRNA. La preparación de estos complejos se realizó en medio Opti-MEM sin suero (GIBCO Ref 319855-047; Lot: 2731525), aprovechando su formulación optimizada con nutrientes y factores de crecimiento para maximizar la viabilidad celular y la eficiencia del proceso. Asimismo, el procedimiento de transfección se llevó a cabo utilizando un medio específico de transfección (preparado días antes y mantenido a 4 °C), basado en la composición habitual del medio completo de las INS-1E descrito previamente, pero prescindiendo de los antibióticos, con el fin de evitar interferencias y optimizar la captación de los siRNA.

Las células INS-1E se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 100.000 células por pocillo. Para la preparación de los complejos de transfección, se diluyó 1 µL de Lipofectamine™

RNAiMAX en 50 μ L de medio Opti-MEM™ y, por separado, 0,75 μ L de siRNA procedente de una solución stock de 20 μ M en 50 μ L de Opti-MEM™, por pocillo. Ambas soluciones se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se mezclaron, obteniéndose un volumen total de 100 μ L. La mezcla resultante se incubó durante 20 minutos adicionales para favorecer la formación de los complejos lipídicos-siRNA.

Tras este periodo de incubación, se añadió el volumen correspondiente de medio de cultivo sin antibióticos y con bajo contenido en suero hasta alcanzar un volumen final de 500 μ L por pocillo. En estas condiciones, la concentración final de siRNA por pocillo fue de 30 nM. Finalmente, los 500 μ L de la mezcla de transfección se añadieron a cada pocillo para llevar a cabo el silenciamiento génico (Figura 3).

Antes de la transfección, el medio de cultivo completo en el que se encontraban las células fue retirado y las células se lavaron una vez con 300 μ L de PBS. Posteriormente, se añadió 500 μ L de mezcla de transfección por pocillo.

Las células se incubaron durante 8 horas a 37 °C y 5% CO₂ con condiciones controladas de humedad. Tras este periodo, el medio de transfección fue sustituido por medio de cultivo completo y las células se mantuvieron en incubación hasta el día siguiente para permitir la expresión del silenciamiento génico.

En nuestro caso, realizamos un doble silenciamiento para optimizar el rendimiento del proceso de tal forma que el mismo protocolo fue repetido al día siguiente en las mismas condiciones y el mismo horario.

Puesto que las moléculas de siRNA tienen asociado a un fluoróforo en su extremo 5' (Alexa Fluor 488), antes de la lisis celular se realizó una observación mediante microscopía de fluorescencia con el fin de verificar la presencia y distribución de la señal fluorescente asociada al siRNA en los cultivos celulares. Esto permitió comprobar la correcta exposición de las células al complejo de transfección. No obstante, la detección de fluorescencia no constituye una evidencia directa de la internalización funcional del siRNA ni de la eficacia del silenciamiento génico.

PREPARACIÓN DE LA MEZCLA DE TRANSFECCIÓN (por pocillo)

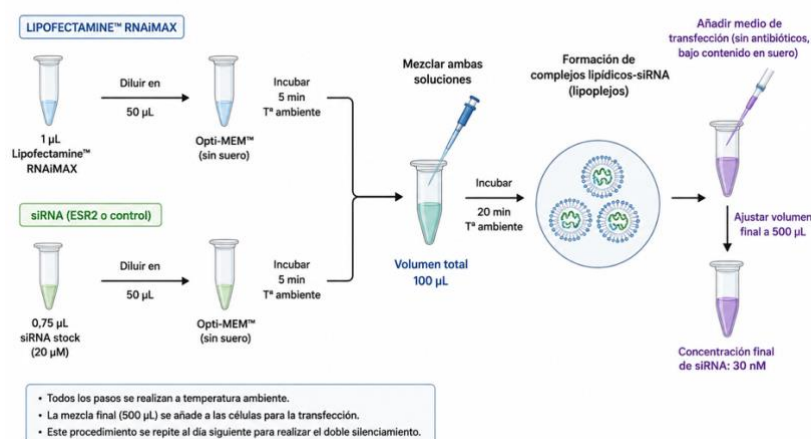


Figura 3. Esquema del protocolo de preparación de la mezcla de transfección de siRNA. Representación del procedimiento seguido para la formación de complejos lipídicos siRNA–Lipofectamine™ RNAiMAX en medio Opti-MEM™ sin suero. Se muestran los pasos de dilución independiente de Lipofectamine™ RNAiMAX y del siRNA (ESR2 o control), su incubación a temperatura ambiente y la posterior mezcla para permitir la formación de lipocomplejos. Finalmente, la solución se completa con medio de transfección hasta un volumen final de 500 µL por pocillo, alcanzando una concentración final de siRNA de 30 nM.

Diseño experimental

Experimento 1: establecimiento de condiciones óptimas para el silenciamiento de *Esr2*

Las células se sembraron los viernes a una densidad de 100.000 células por pocillo en placas de 24 pocillos (Figura 4). Se incubaron durante 3 días a 37 °C en una atmósfera con un 5% de CO₂ y condiciones controladas de humedad hasta alcanzar una confluencia adecuada. El lunes a las 09:00 (día 1) se procedió a realizar la primera transfección con ARN interferente según el protocolo de silenciamiento detallado en el apartado “Protocolo de silenciamiento de ERβ”. En los tres primeros pocillos las células se transfectaron con siRNA específico para el gen *Esr2* y en los tres últimos pocillos las células se transfectaron con un siRNA control a modo de control negativo. A continuación, las células se incubaron durante 8 horas a 37 °C en una atmósfera con un 5% de CO₂ y condiciones controladas de humedad. Pasado el tiempo de incubación (18:00), se les retiró el medio de transfección y se añadieron 500 µL de medio completo. Las células se incubaron hasta la mañana siguiente a 37 °C en una atmósfera con un 5% de CO₂ y condiciones controladas de humedad. El martes a las 09:00 (día 2) se procedió a realizar la segunda transfección con ARN interferente de manera idéntica al procedimiento llevado a cabo durante la primera transfección. El miércoles a las 09:00 (día 3) y tras 24 horas de la segunda transfección se realizó el lisado celular de las células de una de las placas. El jueves a las 09:00 (día 4) y tras 48 horas de la segunda transfección, se realizó el lisado celular de las células de otra de las placas. El viernes a las 09:00 (día 5) y tras 72 horas de la segunda transfección, se realizó el lisado celular de la última de las placas. Los lisados celulares fueron conservados a -80°C hasta el

momento del procesamiento del experimento. Se sembraron 3 placas independientes, una por cada condición experimental, abarcando 6 pocillos por placa, 3 réplicas técnicas por grupo (Figura 5A). El procedimiento experimental completo se realizó en tres semanas independientes, constituyendo un total de 3 réplicas biológicas (n=3).

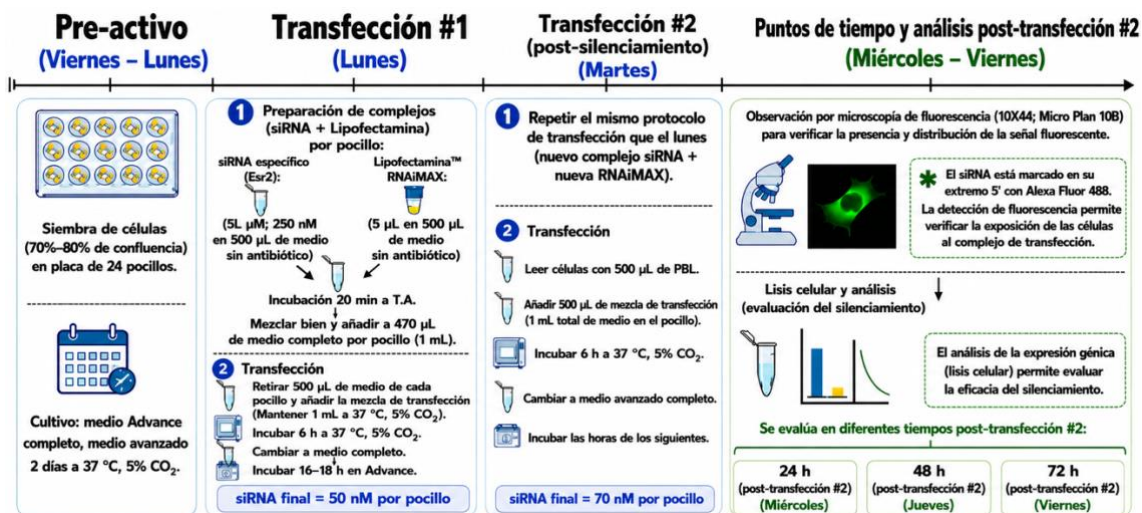


Figura 4. Cronograma experimental del protocolo de doble silenciamiento génico de *Esr2* en células INS-1E. El esquema ilustra las fases del procedimiento: pre-cultivo celular inicial (viernes a lunes), preparación de los complejos de transfección empleando Lipofectamine RNAiMAX en medio Opti-MEM, y la ejecución de la primera y segunda transfección (lunes y martes, respectivamente) con siRNA específico (siERβ) o siRNA control (siCtrl). Se detallan los tres puntos de parada y lisis celular programados a las 24, 48 y 72 horas post-transfección (miércoles, jueves y viernes), precedidos por la confirmación visual de la presencia del siRNA mediante microscopía de fluorescencia convencional gracias al fluoróforo Alexa Fluor 488 acoplado en el extremo 5'. #1: primera transfección; #2: segunda transfección. *Ilustración esquemática generada mediante inteligencia artificial generativa (Gemini Image Generation, 2026).*

Experimento 2: tratamiento a diferentes concentraciones de glucosa en células transfectadas con un ARN interferente para *Esr2* y un ARN interferente control

Las células se sembraron en viernes a una densidad de 100.000 células por pocillo en placas de 24 pocillos un total de 16 pocillos por placa: 8 pocillos por replica biológica (procedentes de diferentes pases celulares) de los cuales 4 pocillos fueron destinados al tratamiento con concentraciones de glucosa de 11 mM (concentraciones basales) y otros 4 pocillos fueron destinados al tratamiento con concentraciones de glucosa 25 mM (alta concentración). Cada grupo (11 mM glucosa y 25 mM glucosa) incluye 2 réplicas técnicas por grupo de transfección (transfección con ARN interferentes específico para *Esr2* y transfección con ARN interferente control) (Figura 5B). Se incubaron durante 3 días a 37 °C en una atmósfera con un 5% de CO₂ y condiciones controladas de humedad hasta alcanzar una confluencia adecuada. El lunes a las 09:00 (día 1) se procedió a realizar la primera transfección con ARN interferente según el protocolo de silenciamiento detallado en el apartado “Protocolo de silenciamiento de ERβ”. A continuación, al igual que en el experimento 1 donde se determinaron las condiciones apropiadas para el silenciamiento, se procedió a realizar el segundo silenciamiento. El miércoles

a las 09:00 (día 3) y tras 24 horas de la segunda transfección se realizaron los tratamientos a diferentes concentraciones glucosa. Se retiró el medio de cultivo completo, se hizo un lavado con 300 μ L de PBS y se añadieron 500 μ L de medio completo a la mitad de los pocillos, medio que contenía 11 mM de glucosa, mientras que a la otra mitad de los pocillos se añadieron 500 μ L de medio completo suplementado hasta alcanzar 25 mM de glucosa. Las células se incubaron durante 6 horas. Este tiempo de exposición se seleccionó con el fin de evaluar respuestas celulares tempranas inducidas por la hiperglucemia, minimizando la pérdida del silenciamiento génico de *Esr2*. El procedimiento experimental completo se realizó en tres semanas independientes, constituyendo un total de 3 réplicas biológicas (n=3) con dos réplicas técnicas por réplica biológica.

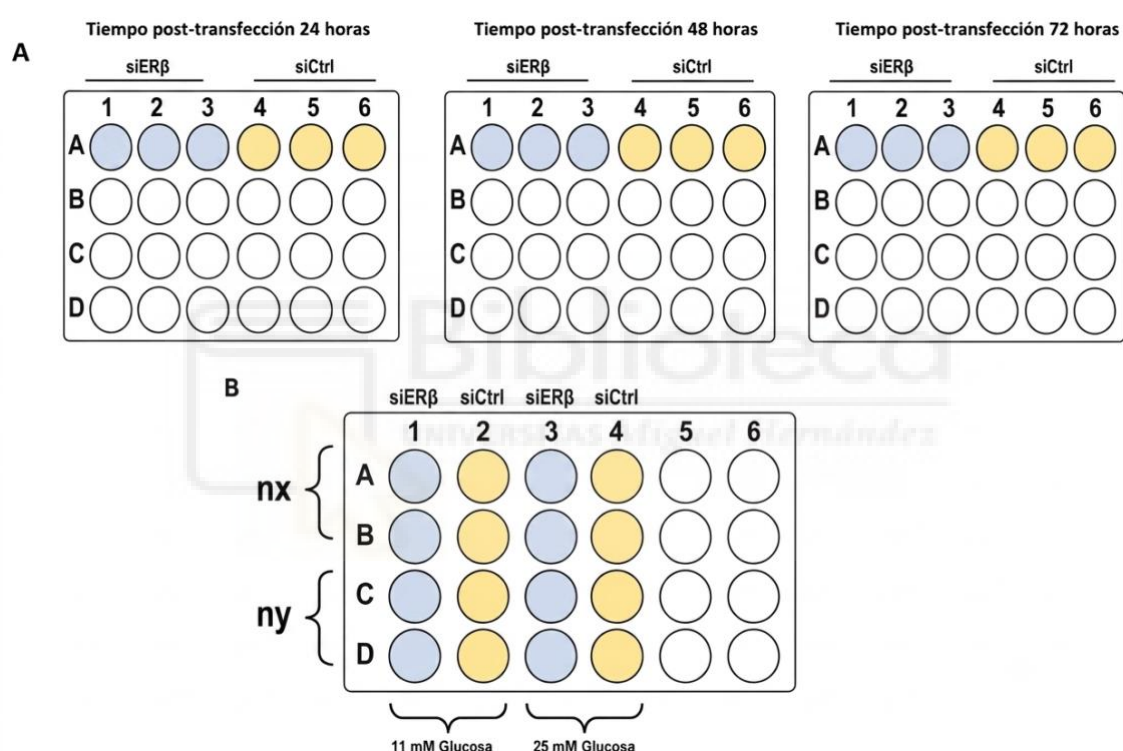


Figura 5. Diseño experimental y distribución de las placas de cultivo para los ensayos. A. Esquema de la distribución de pocillos en placas de 24 pocillos utilizada para evaluar el tiempo óptimo de silenciamiento del receptor ER β a las 24, 48 y 72 horas post-transfección. En cada punto temporal, las réplicas biológicas (n = 3) se dispusieron de forma adyacente en la fila A: los pocillos 1, 2 y 3 (color azul) corresponden a las células transfectadas con el ARN de interferencia específico frente a *Esr2* (siER β), mientras que los pocillos 4, 5 y 6 (color amarillo) contienen las células transfectadas con el ARN control no silenciante (siCtrl). B. El esquema de la combinación de las réplicas biológicas (nx, ny; filas A-B y C-D respectivamente) sometidas a una doble transfección con siRNA específico frente a *Esr2* (siER β , columnas 1 y 3) o siRNA control (siCtrl, columnas 2 y 4). Tras 24 h de la segunda transfección, los cultivos se expusieron a condiciones basales de glucosa (11 mM, columnas 1-2) o a alta concentración de glucosa (25 mM, columnas 3-4) durante un periodo de incubación metabólica previo a los análisis de expresión.

Extracción proteica, cuantificación y Western Blot

Las células se lisaron empleando un tampón de lisis optimizado con detergentes e inhibidores de proteasas y fosfatasa. La base consistió en Lysis Buffer 10X (CST 9803s) y SDS al 10%

(Panreac; Stock: A2572.1000), ajustados a concentraciones finales de 1X y 0.1% respectivamente, junto con un 0.5% de desoxicolato (Sigma, Ref: D6750). Con el fin de preservar la integridad de las proteínas y su estado de fosforilación, se incorporaron inhibidores de proteasas y fosfatasas: Complete Tablets (1X, Roche, Ref: 11873580001), fluoruro de fenilmetilsulfonilo, abreviado como PMSF (1 mM, CALBIOCHEM, Ref: 52332) y fluoruro de sodio, abreviado como NaF (25 mM, SIGMA ALDRICH, Ref: S-7920). El volumen total se completó con agua de grado biología molecular, asegurando un entorno estable. Finalizado el tiempo post-transfección, las células fueron lavadas con PBS, lisadas y almacenadas a -80°C hasta su posterior procesamiento para los análisis de expresión proteica. La concentración total de proteínas de los lisados celulares se determinó mediante un ensayo basado en ácido bicinonínico (BCA). El ensayo BCA es un método colorimétrico para la cuantificación de proteínas basado en la reducción de Cu^{2+} a Cu^{+} por enlaces peptídicos en medio alcalino y la formación de un complejo coloreado con ácido bicinonínico, cuya absorbancia es proporcional a la concentración proteica. La reacción se llevó a cabo empleando el kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, 23225), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para este ensayo empleamos albúmina de suero bovino (proporcionado en el propio kit) como estándar para la elaboración de una curva de calibración. Tanto las muestras como los estándares se analizaron por duplicado en placas de 96 pocillos. Tras la incubación, la absorbancia se midió en un lector de microplacas (Bio-Rad, iMark™ Microplate Reader), y la concentración proteica de cada muestra se calculó mediante interpolación a partir de la curva estándar de BSA, se calculó la concentración de proteínas de cada lisado celular, expresándose en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Una vez determinada la concentración proteica, las muestras se ajustaron a $1\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$ con agua destilada y tampón de carga Laemmli 4X (Tris-HCl 250 mM pH 6,8, SDS al 8%, glicerol al 16%, azul de bromofenol al 0,4% y β -mercaptoetanol al 10% como agente reductor), para normalizar la cantidad de proteína por muestra, y se almacenaron a -80°C hasta su análisis por electroforesis. Las mezclas se incubaron a 95°C durante 5 minutos en un bloque térmico para asegurar la completa desnaturalización y reducción de las proteínas antes de su carga en el gel de electroforesis.

Western Blot

En este trabajo, utilizamos la técnica de Western Blot para comprobar si los niveles de ER β disminuían tras el protocolo de silenciamiento aplicado contra el gen *Esr2* con siRNA. Analizar varios puntos temporales después de la transfección nos permitió verificar, no solo si el silenciamiento era eficaz, sino también cómo evolucionaba la reducción de ER β a medida que avanzaba el tiempo. Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10 %, preparados con Trizma Base pH 8,8 (Sigma, T1503), SDS (Panreac, A2572.1000),

acrilamida al 30 % (Bio-Rad, 1610156), APS al 1 % y TEMED (Bio-Rad, 1610800). La electroforesis se realizó con un tampón de electroforesis específico (Tris 25 mM, glicina 192 mM (PanReac AppliChem, A1067), SDS 0,1 %) cargando 25 µL de muestra y el marcador de peso molecular (*PageRuler Prestained Protein Ladder*, Thermo Scientific; 3076554, 3043168), aplicando 90 V y posteriormente 130 V.

Tras la separación, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Bio-Rad, 0,2 µm, 64691840) mediante Trans-Blot Turbo en programa “7 min Mini Gel”. La membrana se bloqueó con leche desnatada al 5 % en TBS-T durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubó overnight a 4 °C con anticuerpo primario diluido en TBS-T con BSA al 5 % y azida sódica al 0,01 %, seguido de incubación con anticuerpo secundario conjugado con HRP (1:5000) en leche al 5 % en TBS-T durante 1 h a temperatura ambiente.

La detección se realizó mediante quimioluminiscencia con SuperSignal™ West Femto (Thermo Scientific, 34096) y adquisición de señal con ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad). La cuantificación densitométrica se llevó a cabo mediante el software ImageLab.

Aislamiento, cuantificación y retrotranscripción de ARN

El ARN total se aisló a partir de los lisados celulares mediante el kit NucleoSpin® RNA (Bioanalysis; NucleoSpin® RNA; 740955.250), utilizando columnas de centrifugación con membrana de sílice. Brevemente, tras la inactivación de RNasas mediante el tampón de lisis y la homogeneización de la muestra, el ARN se fijó selectivamente a la matriz de sílice. Para garantizar la eliminación de contaminantes y del ADN genómico residual, se realizaron los lavados recomendados por el protocolo y una digestión con la DNasa I todo suministrado en el kit. El ARN purificado se eluyó finalmente en 40 µL de agua libre de RNasas.

La concentración y pureza del ARN se determinaron por espectrofotometría empleando un equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Se evaluaron las relaciones de absorbancia a 260/280 nm y 260/230 como indicadores de la calidad del ácido nucleico, considerando óptimos los valores comprendidos entre 1.8 y 2.2.

Para la síntesis de ADN complementario (ADNc), se retrotranscribieron 500 ng de ARN total por muestra utilizando el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific; 4368814). La reacción se llevó a cabo en un termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories) siguiendo el protocolo estándar del fabricante: incubación a 25 °C durante 10 min para la hibridación de cebadores, seguida de 37 °C durante 120 min para la síntesis de ADNc y una fase final de inactivación de la transcriptasa reversa a 85 °C durante 5 min. El ADNc obtenido se almacenó a -20 °C hasta su uso en los ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).

Análisis de expresión génica mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

La evaluación de la expresión génica se llevó a cabo mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) usando el ADNc previamente sintetizado. Analizamos la expresión génica de los genes *Pdx1*, *Mafa*, *Nkx6.1*, *Ins1*, *Hspa5* y *Ddit3*. Para ello empleamos cebadores previamente diseñados y testados en el laboratorio que cumplen los requisitos de generar amplicones de pequeño tamaño (50-100pb), contenido de GC (30-80%), temperatura de fusión de 58-60°C. Las secuencias de los cebadores están descritas en la Tabla1.

Tabla 1. Secuencias de los cebadores utilizados en la qPCR

Gen	Cebador Sentido (5'→3')	Cebador Antisentido (5'→3')	Especie	Código RefSeq
<i>Ddit3</i>	CCAGCAGAGGTCACAAGCAC	CGCACTGACCACTCTGTTC	<i>R. norvegicus</i>	NM_001109986.1
<i>Esr2</i>	GGTGCTAATGGTGGGACTGA	CCCCTCATCCCTGTCCAGAA	<i>R. norvegicus</i>	NM_012754.3
<i>Hprt1</i>	GTCCCAGCGTCGTGATTAGT	GCAAGTCTTTCAGTCCTGTCC	<i>R. norvegicus</i>	NM_012583.2
<i>Hspa5</i>	GTGCCACCAAGAAGTCTCA	AGGGGTCGTTACCTTCGTA	<i>R. norvegicus</i>	NM_013083.2
<i>Ins1</i>	ACCTTTGTGGTCCTCACCTG	AGCTCCAGTTGTGGCACTTG	<i>R. norvegicus</i>	NM_019129.3
<i>Mafa</i>	GCACATTCTGGAGAGCGAGA	TTCTCCTTGACAGGTCCCG	<i>R. norvegicus</i>	NM_001399773.1
<i>Nkx6.1</i>	GAGAGTCAGGTCAAGGTCTGG	CGTTCTCCGAAGTCCCCTTG	<i>R. norvegicus</i>	NM_031737.2
<i>Pdx1</i>	CAAAGCTCACGCGTGGAAAA	AGGCTGTACGGGTCTCTTA	<i>R. norvegicus</i>	NM_022852.4

Nota. Todos los cebadores están orientados en sentido 5' → 3'. Los códigos de acceso corresponden a las secuencias de referencia validadas de la base de datos RefSeq (*Rattus norvegicus*). Los nombres de los genes siguen la nomenclatura oficial de la base de datos de NCBI. *Hprt1* se empleó como gen de referencia constitutivo (control interno de carga).

Condiciones de qPCR

Las muestras de ADNc fueron diluidas en una proporción 1:5 con agua libre de nucleasas para asegurar una amplificación óptima y uniforme. Sin embargo, la elevada abundancia del transcrito *Ins1* y su alta variabilidad entre los duplicados hizo necesaria una dilución adicional del ADNc (dilución final de 1:1000), con el objetivo de evitar la saturación de la señal fluorescente y asegurar que la amplificación se mantuviera dentro del rango lineal de cuantificación del ensayo.

El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos, donde se combinó la mezcla de reacción iQ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad; 64676059) con los cebadores específicos a una concentración de 200nM (sentido y antisentido) y el ADNc correspondiente a cada muestra, empleando un termociclador de PCR (BioRad; T100™ Thermal Cycler) a tiempo real bajo las condiciones térmicas validadas para cada pareja de cebadores.

Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo en un termociclador de PCR a tiempo real utilizando el siguiente programa de amplificación:

- Desnaturalización inicial: 95 °C durante 3 minutos.
- Amplificación (45 ciclos):
 - Desnaturalización: 95 °C durante 15 segundos.
 - Alineamiento y extensión: 60 °C durante 1 minuto.

Al finalizar la amplificación, se revisó la curva de disociación (*melting curve* o curva de fusión) para comprobar la especificidad de los productos amplificados y descartar la presencia de amplificaciones inespecíficas o formación de dímeros de cebadores.

Análisis de la expresión génica y normalización de datos de qPCR

Para corregir las variaciones en la carga inicial de ácido nucleico, se utilizó el gen *Hprt1* como control endógeno (*housekeeping gene*). Los niveles relativos de expresión se determinaron mediante el método del umbral de ciclo comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), representando el cambio de expresión génica respecto a la condición siCtrl a 11mM Glucosa.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism. Los resultados se expresan como media $\pm$ error estándar de la media (SEM) de, al menos, tres experimentos independientes (3 réplicas biológicas).

Debido a que el primer diseño experimental incluía dos factores independientes, el tratamiento (control vs. siRNA) y el tiempo (24, 48 y 72 h), para el análisis estadístico para evaluar el efecto del silenciamiento del gen *Esr2* a distintos puntos temporales tras la transfección se empleó un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey para determinar las diferencias significativas entre las distintas condiciones experimentales. De forma similar, para analizar simultáneamente el efecto del silenciamiento de *Esr2* y de la concentración de glucosa sobre la expresión génica, se utilizó un análisis de la varianza de dos factores (Two-way ANOVA). Este método permite evaluar de forma independiente el efecto de cada uno de los factores experimentales estudiados, el silenciamiento de ER β (siER β frente a siCtrl) y la concentración de glucosa (11 mM frente a 25 mM), así como determinar la posible existencia de una interacción entre ambos factores. De este modo, el análisis permite discernir si los cambios observados en la expresión génica son atribuibles al silenciamiento de ER β , al tratamiento con glucosa elevada o a una combinación de ambos estímulos.

No obstante, dado que uno de los objetivos principales de este trabajo fue determinar específicamente la contribución de ER β al mantenimiento de la identidad de la célula β pancreática en condiciones fisiológicas, se realizaron análisis adicionales comparando exclusivamente los grupos siER β y siCtrl cultivados en glucosa basal (11 mM). Para ello se empleó

la prueba t de Student no apareada, que permite comparar las medias de dos grupos independientes y determinar si las diferencias observadas son estadísticamente significativas. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor de p fue inferior a 0,05. Los niveles de significación estadística se representaron como: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

4. Resultados

Validación de anticuerpos para la óptima detección de ER β mediante técnicas inmunológicas

La literatura científica ha puesto de manifiesto de manera recurrente que uno de los mayores obstáculos en el estudio de ER β es la falta de especificidad de los anticuerpos comerciales disponibles. Por este motivo, se llevó a cabo un cribado sistemático de tres anticuerpos comerciales específicos frente a ER β : Invitrogene Cat# MA5-248077 (Clon PPZ0506), Life Tech. Cat# 51-7700 y Thermo Scientific Cat# MA1-23217 (Clon 14C8) con el objetivo de determinar cuál de ellos ofrecía la mayor afinidad y resolución para su análisis mediante Western blot.

Los ensayos comparativos revelaron diferencias drásticas en el patrón de reconocimiento de cada anticuerpo. El anticuerpo Cat# MA1-23217 (al que a partir de ahora me referiré como 14C8) mostró el rendimiento más deficiente, caracterizado por una elevada presencia de ruido y de múltiples bandas inespecíficas que impedían la correcta identificación y cuantificación del receptor (Figura 6A). Por otro lado, el anticuerpo Cat# MA5-248077 (al que a partir de ahora me referiré como PPZ) exhibió un comportamiento intermedio: supuso una mejora notable en comparación con el 14C8 al reducir parte del ruido de fondo. A pesar de que también se observan bandas inespecíficas, se ve una banda clara con una intensidad mayor en el rango de peso molecular de ER β (Figura 6B). En contraposición, el anticuerpo Cat# 51-7700 (al que a partir de ahora me referiré como 517700) demostró ser el único capaz de proporcionar una señal limpia, nítida y altamente específica para el peso molecular correspondiente a ER β (Figura 6C). Por lo tanto, evaluaremos tanto el anticuerpo PPZ como 51-7700 en las bandas correspondientes entre 55 y 70KDa bien definidas para determinar la eficacia del silenciamiento del recepto de estrógenos.

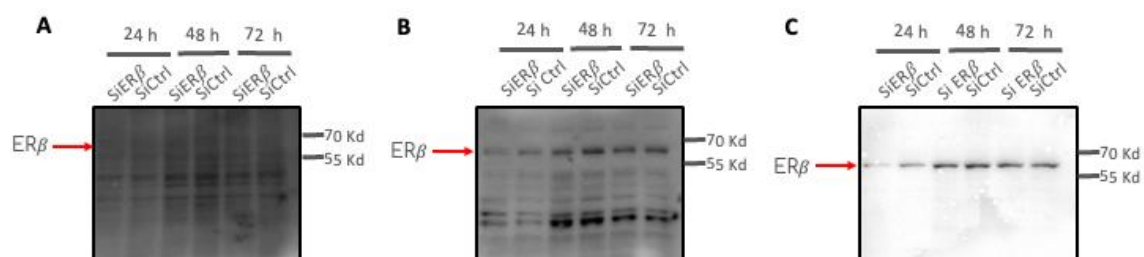


Figura 6. Expresión del receptor ER β en la línea celular INS-E1 tras dos silenciamientos con ARN interferente para el ARNm del gen *Esr2* (ESR2_RAT, SICO058646) y un ARN interferente a modo de control negativo (AllStars, SIO3650318) evaluada por Western Blot. Ambos silenciamientos se aplicaron durante 8 horas en dos días consecutivos. Niveles de expresión de la proteína ER β después de 24, 48 y 72 horas del segundo silenciamiento A: Imagen representativa de Western Blot para la detección de los niveles de proteína ER β a los distintos tiempos post-silenciamiento usando el anticuerpo Thermo Scientific Cat# MA1-23217 (Clon 14C8). B: Imagen representativa de Western Blot para la detección de los niveles de proteína ER β a los distintos tiempos post-silenciamiento usando el anticuerpo Invitrogene Cat# MA5-248077 (Clon PPZ0506). C: Imagen representativa de Western Blot para la detección de los niveles de proteína ER β a los distintos tiempos post-silenciamiento usando el anticuerpo Life Tech. Cat# 51-7700.

Optimización y validación de la ventana temporal óptima para el silenciamiento de ER β

Para poder profundizar en el papel biológico de ER β en la fisiología pancreática a través de la inhibición de su actividad, el primer paso consistió en evaluar la ventana temporal de máxima eficacia del silenciamiento génico. Para ello, se monitorizaron los niveles de expresión de ER β normalizados frente a β -actina a las 24, 48 y 72 horas posteriores a la transfección con el ARN de interferencia específico para (siER β), empleando un ARN control (siCtrl) como referencia basal. Los resultados se expresan como cambio relativo (*fold-change*) respecto a la condición siCtrl a las 24h (Figura 7).

El análisis cuantitativo a partir de los resultados experimentales obtenidos mediante la técnica de Western blot usando el anticuerpo PPZ y el anticuerpo 51-7700, reveló un perfil cinético marcadamente dependiente del tiempo post-transfección. Como se puede observar en la comparativa de las primeras dos columnas de la Figura 7A, usando el anticuerpo PPZ para la detección de la proteína ER β , el análisis mediante ANOVA de dos factores reveló que, a las 24 horas, se produce una reducción drástica y estadísticamente significativa en los niveles de ER β en las células transfectadas con siER β en comparación con su respectivo control siCtrl ($*p < 0,05$). Por otro lado, cuando la detección proteica se hizo usando el anticuerpo 51-7700 (Figura 7B), la tendencia fue la misma, aunque el análisis mediante ANOVA de dos factores no mostró diferencias significativas. Sin embargo, este efecto de reducción de la expresión en el receptor fue perdiéndose en los puntos temporales posteriores, correspondientes a las 48 y 72 horas. La expresión de la proteína en las células tratadas con siER β experimentó una recuperación progresiva, llegando a equipararse por completo a los niveles del grupo control. De hecho, el análisis estadístico confirmó la ausencia total de diferencias significativas en los intervalos de tiempo 48h y 72h, lo que evidencia que el efecto del silenciamiento se disipa paulatinamente a partir de las 24 horas.

Estos resultados aportan una información importante para el desarrollo de la línea experimental de este trabajo. La constatación de que el silenciamiento efectivo de ER β se concentra únicamente a las 24 horas post-transfección, nos permite delimitar con precisión la ventana de

intervención biológica. Por consiguiente, se determinó fijar este punto temporal como el idóneo para llevar a cabo los siguientes experimentos enfocados en analizar cómo la pérdida de este receptor estrogénico compromete o altera los mecanismos moleculares que definen la identidad de la célula-beta pancreática.

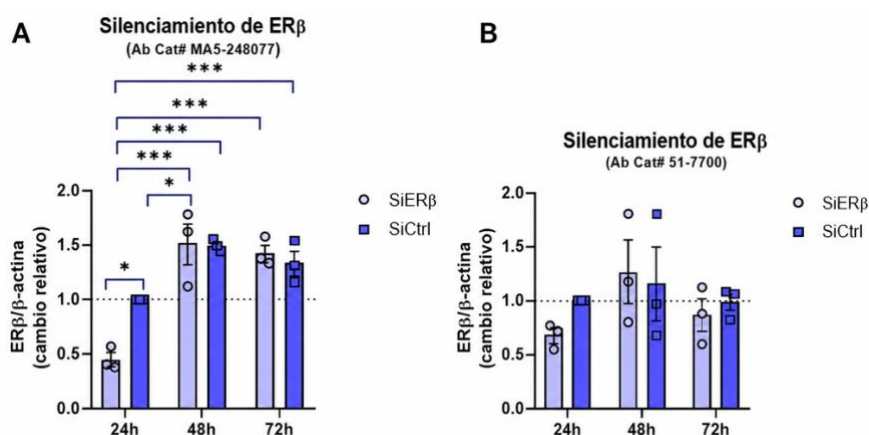


Figura 7. Cuantificación por Western blot del receptor ER β en la línea celular INS-1E tras dos silenciamientos con ARN interferente para el ARNm del gen *Esr2* (ESR2_RAT, SICO058646) y un ARN interferente a modo de control negativo (AllStars, SIO3650318) empleando diferentes anticuerpos. Ambos silenciamientos se aplicaron durante 8 horas en dos días consecutivos. Niveles de expresión de la proteína ER β después de 24, 48 y 72 horas del segundo silenciamiento A: Cuantificación densitométrica de los niveles de proteína ER β normalizados frente a β -actina usando el anticuerpo PPZ0506. Los resultados se expresan como cambio relativo (*fold change*) respecto a la condición siCtrl a las 24h. La línea de puntos indica el nivel basal de referencia. Se observa una disminución estadísticamente significativa en la expresión del receptor únicamente a las 24 horas posteriores a la segunda transfección, momento en el cual se registra la máxima eficacia de silenciamiento. A las 48 y 72 horas, los niveles proteicos se recuperan hasta equipararse al control, evidenciando el carácter transitorio del silenciamiento. B: Cuantificación densitométrica de los niveles de proteína ER β normalizados frente a β -actina usando el anticuerpo 51-7700. Los resultados se expresan como cambio relativo (*fold change*) respecto a la condición siCtrl a las 24h. La línea de puntos indica el nivel basal de referencia. Los datos representan la media $\pm$ SEM ($n = 3$). Análisis estadístico mediante ANOVA de dos factores seguido de la prueba post hoc de Tukey. (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).

Como estrategia de control metodológico, el siRNA empleado en los ensayos se encontraba conjugado con el fluoróforo AlexaFluor 488. Esto nos permitió confirmar visualmente si el siRNA estaba presente los días posteriores de la transfección mediante microscopio de epifluorescencia convencional antes de proceder a los análisis moleculares. Cabe destacar que esta aproximación microscópica se utilizó exclusivamente para verificar la presencia del siRNA en las células diana y evaluar la homogeneidad del procedimiento, pero no como una medida directa del silenciamiento génico, el cual requiere de la validación proteica posterior (Figura 8).

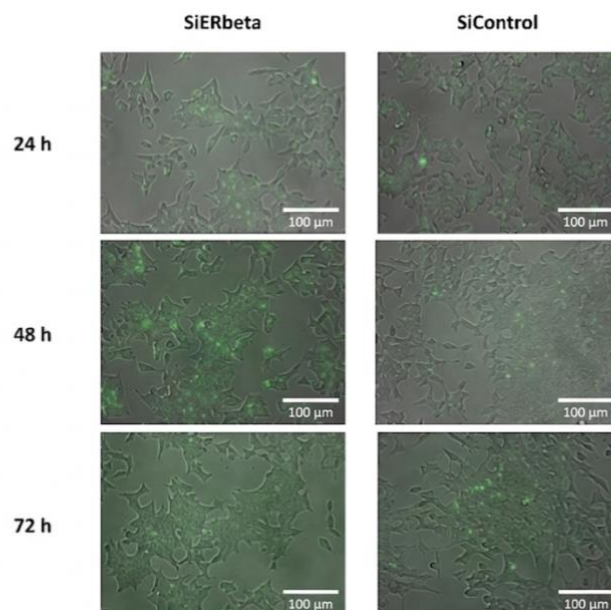


Figura 8. Imágenes al microscopio de epifluorescencia convencional donde los puntos verdes indican la localización de los ARN interferentes usados, objetivo 20x

Validación del silenciamiento de ERβ mediante RT-qPCR

Para confirmar el éxito del silenciamiento génico, evaluamos los niveles de expresión de *Esr2* mediante RT-qPCR en células INS-1E tras transfectarlas con un siRNA específico contra ERβ (siERβ) o con un siRNA control (siCtrl). Además, quisimos comprobar si la exposición a altas concentraciones de glucosa (25 mM) podía alterar la eficiencia de este bloqueo.

Los resultados estadísticos empleando la prueba t de Student (Figura 9) mostraron que la transfección con siERβ redujo significativamente los niveles de ARNm de *Esr2* en comparación con el grupo siCtrl en condiciones basales de glucosa (11 mM), observándose una disminución cercana al 50 % (** $p < 0,001$). En presencia de glucosa alta (25 mM), también se observó una reducción de la expresión de *Esr2* respecto a su control correspondiente, de magnitud similar a la detectada en condiciones basales; sin embargo, esta diferencia no alcanzó significación estadística. A pesar de ello, la tendencia observada sugiere que el silenciamiento se mantuvo parcialmente eficaz también bajo condiciones de alta glucosa.

Cabe destacar que el propio tratamiento con glucosa alta no modificó significativamente la expresión de *Esr2* dentro de cada condición experimental. En conjunto, estos resultados indican que la disminución de los niveles de *Esr2* se debió principalmente a la acción del siRNA específico y no al contexto glucémico del cultivo.

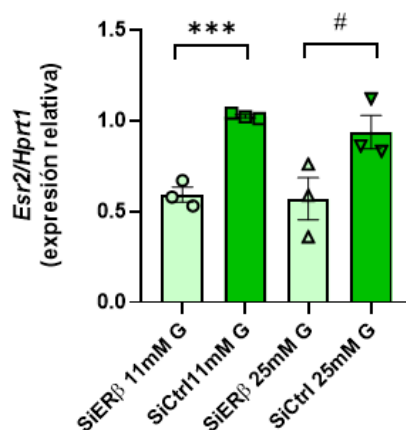


Figura 9. Validación del silenciamiento de *Esr2* mediante RT-qPCR en células INS-1E. Niveles de expresión relativa de *Esr2* en células INS-1E transfectadas con un siRNA específico frente a ERβ (siERβ) o con un siRNA control no dirigido (siCtrl), cultivadas en condiciones basales de glucosa (11 mM) o expuestas a alta glucosa (25 mM) durante 6 horas. La expresión génica se determinó mediante RT-qPCR utilizando *Hprt1* como gen de referencia. Los niveles relativos de expresión se determinaron mediante el método del umbral de ciclo comparativo ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), representando el cambio de expresión génica respecto a la condición siCtrl a 11mM Glucosa. Los datos se presentan como media $\pm$ SEM de tres experimentos independientes ($n = 3$). El análisis estadístico se realizó mediante un t de Student no apareada (t-test). *** $p < 0,001$ y # $p < 0,1$ frente al grupo control correspondiente. G: glucosa.

En definitiva, estos datos constatan que el protocolo de silenciamiento diseñado funciona eficazmente para reprimir la expresión de *Esr2* en la línea INS-1E. Esto valida el uso de este sistema celular como un modelo experimental fiable para profundizar en el papel de ERβ dentro de la identidad de la célula-β pancreática, así como en su comportamiento frente al estrés glucotóxico.

Análisis de expresión de marcadores de identidad de la célula-β pancreática

Con el objetivo de determinar si ERβ participa en el mantenimiento de la identidad de la célula-β pancreática, se analizó mediante RT-qPCR la expresión de tres factores de transcripción fundamentales para la diferenciación, maduración y función de estas células: *Mafa*, *Nkx6.1*, y *Pdx1*. Estos genes desempeñan un papel esencial en la regulación del programa transcripcional característico de la célula-β y son ampliamente utilizados como marcadores de identidad.

Inicialmente, se evaluó el efecto conjunto del silenciamiento de *Esr2* y de la exposición a alta glucosa (25 mM) mediante un análisis estadístico de dos factores (Two-way ANOVA), considerando como variables independientes la transfección (siERβ o siCtrl) y la concentración de glucosa (11 mM o 25 mM). No se observaron diferencias significativas en la expresión de *Mafa* ni de *Nkx6.1* entre los distintos grupos experimentales (Figura 10 A y B). Sin embargo, la expresión de *Pdx1* fue menor en las células control expuestas a glucosa alta (siCtrl 25 mM) que en las células con ERβ silenciado mantenidas en glucosa basal (siERβ 11 mM). Esto podría sugerir que la exposición a glucosa elevada ejerce un efecto negativo sobre la expresión de *Pdx1* más acusado que el propio silenciamiento de ERβ en condiciones basales (Figura 10C).

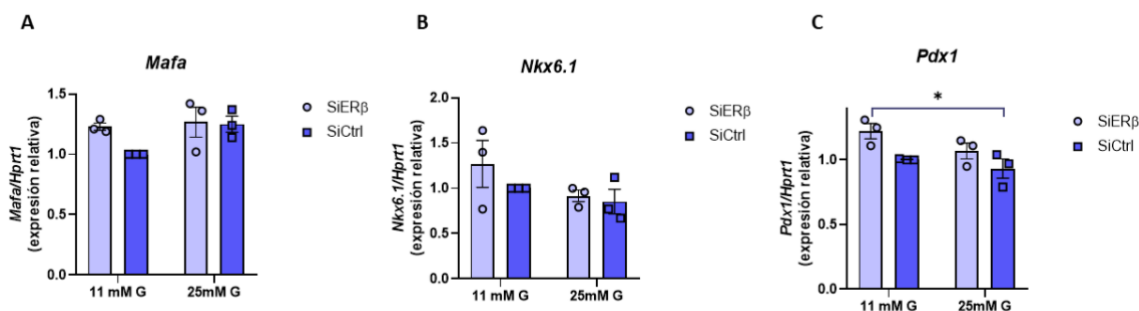


Figura 10. Efecto del silenciamiento de *Esr2* sobre la expresión de factores de transcripción asociados a la identidad de la célula-β pancreática. Expresión relativa de *Mafa* (A), *Nkx6.1* (B) y *Pdx1* (C) en células INS-1E transfectadas con un siRNA específico frente a ERβ (siERβ) o un siRNA control (siCtrl) y cultivadas en presencia de 11 mM o 25 mM de glucosa. La expresión génica se determinó mediante RT-qPCR utilizando *Hprt1* como gen de referencia. La expresión génica se normalizó frente a *Hprt1* y los niveles relativos de expresión se determinaron mediante el método del umbral de ciclo comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), representando el cambio de expresión génica respecto a la condición siCtrl a 11mM Glucosa. Los datos se representan como media $\pm$ SEM de tres experimentos independientes ($n = 3$). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de dos factores seguido de la prueba post hoc de Tukey. * $p < 0,05$.

Dado que el objetivo principal de este trabajo era evaluar específicamente la contribución de ERβ al mantenimiento de la identidad β en condiciones fisiológicas y sin la posible influencia de fenómenos de glucotoxicidad, se realizó un análisis adicional comparando exclusivamente los grupos siERβ y siCtrl cultivados en glucosa basal (11 mM) mediante una prueba t de Student. Este análisis mostró un aumento significativo de la expresión de *Mafa* y *Pdx1* en las células transfectadas con siERβ respecto a sus correspondientes controles (Figura 11 A y B). Además, se observa un aumento en la expresión de *Mafa* en las células del grupo control tratadas a altas concentraciones de glucosa. No obstante, aunque se observó una tendencia al aumento en la expresión de *Nkx6.1*, las diferencias no alcanzaron significación estadística (Figura 11 C).

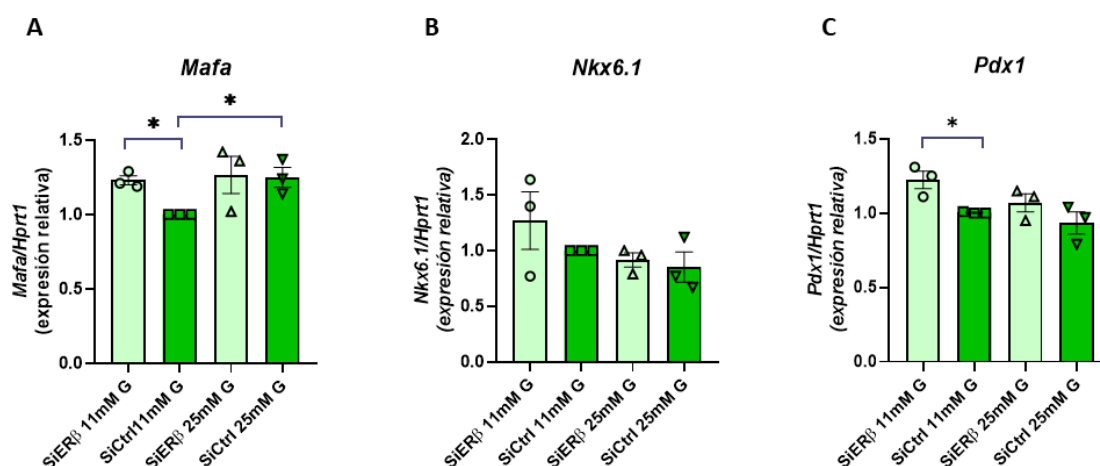


Figura 11. Efecto del silenciamiento de *Esr2* sobre la expresión de factores de transcripción asociados a la identidad de la célula β pancreática. Expresión relativa de *Mafa* (A), *Nkx6.1* (B) y *Pdx1* (C) en células INS-1E transfectadas con un siRNA específico frente a ERβ (siERβ) o un siRNA control (siCtrl) y cultivadas en presencia de 11 mM o 25 mM de glucosa. Los gráficos muestran la comparación específica entre los diferentes grupos en condiciones basales de glucosa (11 mM) y alta glucosa (25 mM) realizada mediante una prueba t de Student no apareada * $p < 0,05$. La expresión génica se normalizó frente a *Hprt1* y los

niveles relativos de expresión se determinaron mediante el método del umbral de ciclo comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), representando el cambio de expresión génica respecto a la condición siCtrl a 11mM Glucosa. Los datos se representan como media $\pm$ SEM de tres experimentos independientes (n = 3). El análisis estadístico se realizó mediante un t de Student no apareada (t-test). *p < 0,05

A continuación, evaluamos los niveles de expresión del gen *Ins1*. De nuevo, los datos fueron analizados mediante un ANOVA de dos factores, considerando como factores el tratamiento de silenciamiento y la concentración de glucosa (Figura 12A). Este análisis no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales.

Dado que el foco principal del estudio se centró en determinar el papel de ER β en el mantenimiento de la identidad de la célula- β en condiciones fisiológicas, se realizó un análisis específico comparando únicamente los grupos siER β 11 mM y siCtrl 11 mM mediante una prueba t de Student (Figura 12B). Este análisis reveló una disminución significativa de la expresión de *Ins1* en las células sometidas a silenciamiento de ER β respecto al grupo control (*p < 0,05).

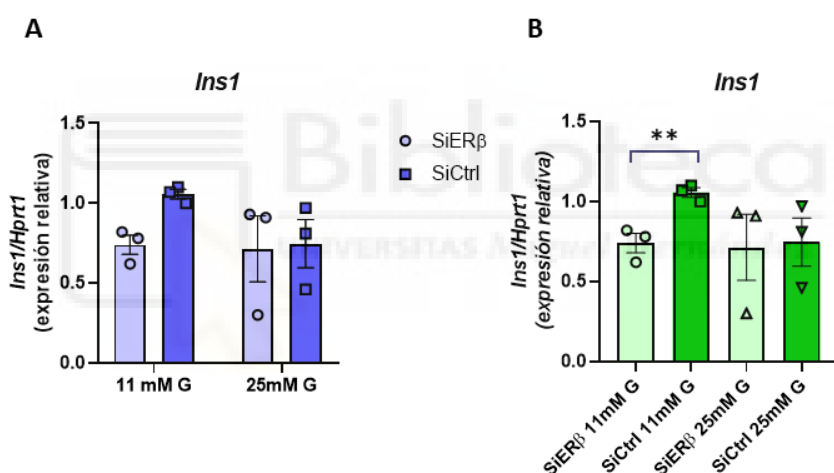


Figura 12. Expresión relativa de *Ins1* tras el silenciamiento de ER β en condiciones de glucosa basal y elevada. (A) Niveles de expresión de *Ins1*, determinados mediante RT-qPCR, en células transfectadas con siRNA dirigido contra ER β (siER β) o con un siRNA control (siCtrl) y cultivadas en presencia de 11 mM o 25 mM de glucosa. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de dos vías (B) Comparación específica de la expresión de *Ins1* entre los grupos siER β 11 mM y siCtrl 11 mM mediante prueba t de Student, con el fin de evaluar el efecto del silenciamiento de ER β en condiciones basales de glucosa. La expresión génica se normalizó frente a *Hprt1* y los niveles relativos de expresión se determinaron mediante el método del umbral de ciclo comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), representando el cambio de expresión génica respecto a la condición siCtrl a 11mM Glucosa. Los datos se representan como media $\pm$ SEM de tres experimentos independientes (n = 3). **p < 0,01.

Evaluación de marcadores de glucotoxicidad

Con el objetivo de evaluar una posible inducción de estrés del retículo endoplásmico asociada a la glucotoxicidad o al silenciamiento de ER β , se analizaron los niveles de expresión de los genes *Hspa5* y *Ddit3*. El análisis mediante ANOVA de dos factores no reveló diferencias significativas atribuibles ni al tratamiento con glucosa ni al silenciamiento de ER β , ni tampoco a la interacción entre ambos factores (Figura 13). De forma complementaria, se realizaron comparaciones

mediante la prueba t de Student (Figura 14). Únicamente se observa una disminución significativa de la expresión génica en las células transfectadas con siER β y expuestas a 25 mM de glucosa respecto al grupo siCtrl mantenido en condiciones basales (11 mM de glucosa) (Figura 14B). Sin embargo, esta comparación enfrenta simultáneamente diferencias tanto en la condición de silenciamiento como en la concentración de glucosa, por lo que carece de relevancia biológica para los objetivos del estudio y no permite extraer conclusiones sobre el efecto específico de ER β o de la glucotoxicidad. En conjunto, los resultados indican que ninguno de los tratamientos evaluados produjo cambios significativos en la expresión de los marcadores de estrés del retículo endoplásmico analizados.

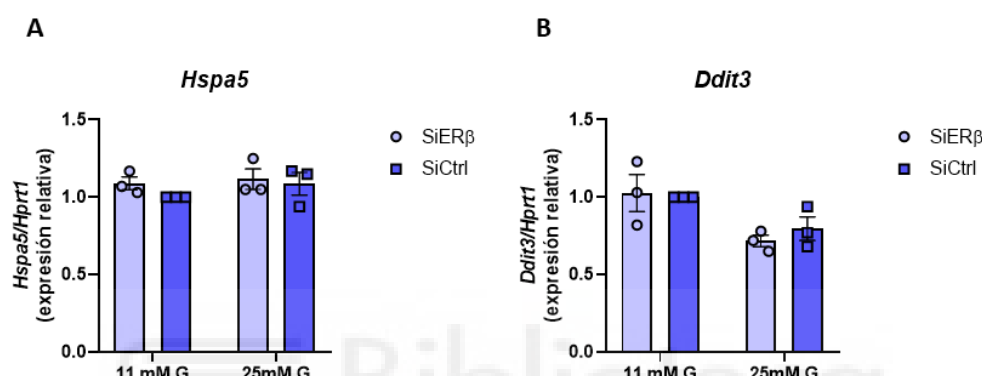


Figura 13. Expresión de marcadores de estrés del retículo endoplasmático tras el silenciamiento de ER β y el tratamiento con diferentes concentraciones de glucosa. Niveles de expresión relativa *Hspa5*(A) y *Ddit3*(B) en células INS-1E transfectadas con un siRNA específico frente a ER β (siER β) o con un siRNA control no dirigido (siCtrl), cultivadas en condiciones basales de glucosa (11 mM) o expuestas a alta glucosa (25 mM) durante 6 horas. Los gráficos muestran el análisis conjunto de los cuatro grupos experimentales mediante ANOVA de dos factores (Two-way ANOVA). La expresión génica se normalizó frente a *Hprt1* y los niveles relativos de expresión se determinaron mediante el método del umbral de ciclo comparativo ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), representando el cambio de expresión génica respecto a la condición siCtrl a 11mM Glucosa. Los datos se representan como media $\pm$ SEM de tres experimentos independientes (n = 3). **p < 0,01.

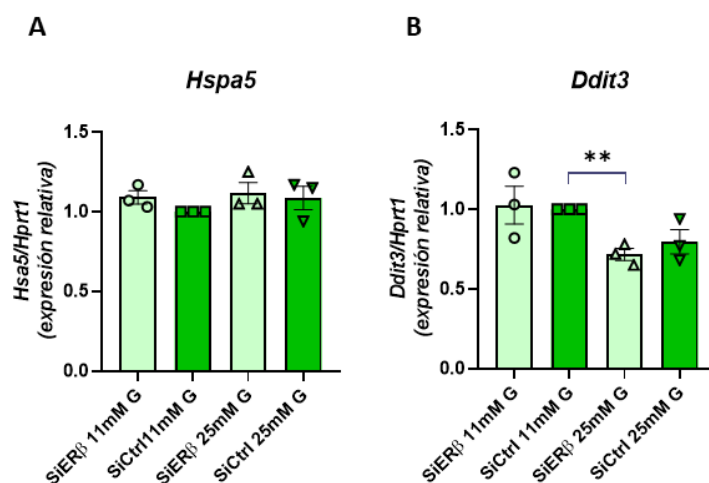


Figura 14. Expresión de marcadores de estrés del retículo endoplasmático tras el silenciamiento de ER β y el tratamiento con diferentes concentraciones de glucosa. Niveles de expresión relativa Bip (*Hspa5*) (A) y CHOP (*Ddit3*) (B) en células INS-1E transfectadas con un siRNA específico frente a ER β (siER β) o con un siRNA control no dirigido (siCtrl), cultivadas en condiciones basales de glucosa (11 mM) o expuestas a alta

glucosa (25 mM) durante 6 horas. Los gráficos muestran la comparación específica entre los diferentes grupos en condiciones basales de glucosa (11 mM) y alta glucosa (25 mM) realizada mediante una prueba t de Student no apareada * $p < 0,05$. La expresión génica se normalizó frente a *Hprt1* y los niveles relativos de expresión se determinaron mediante el método del umbral de ciclo comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), representando el cambio de expresión génica respecto a la condición siCtrl a 11mM Glucosa. Los datos se representan como media $\pm$ SEM de tres experimentos independientes ($n = 3$). ** $p < 0,01$.

5. Discusión

El presente trabajo describe el papel del receptor de estrógenos beta (ER β) en el mantenimiento de la identidad de la célula- β pancreática y analiza su posible participación en la respuesta celular frente a condiciones de glucotoxicidad. Para ello, se estableció un modelo de silenciamiento de *Esr2* en la línea celular INS-1E y se evaluó el impacto de la disminución de ER β sobre la expresión de genes asociados a la identidad β pancreática y al estrés del retículo endoplasmático.

Uno de los primeros objetivos abordados en este trabajo fue la validación experimental de los anticuerpos empleados para la detección de ER β . La identificación específica de este receptor representa un desafío bien documentado en la literatura científica, ya que numerosos estudios han puesto de manifiesto las limitaciones de muchos anticuerpos comercialmente disponibles, cuya falta de especificidad puede dar lugar a señales inespecíficas y comprometer la reproducibilidad de los resultados [32]. En concordancia con estas observaciones, nuestros resultados mostraron diferencias notables entre los anticuerpos evaluados. Mientras que el anticuerpo 14C8 presentó un elevado nivel de ruido de fondo y bandas inespecíficas, los anticuerpos PPZ y 517700 mejoraron la señal siendo 517700 el único capaz de detectar una señal limpia y reproducible. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de validar cuidadosamente las herramientas inmunológicas empleadas para el estudio de este receptor y refuerzan las observaciones previas que cuestionan la fiabilidad de numerosos anticuerpos comerciales frente a ER β .

A continuación, se determinó la ventana temporal más adecuada para estudiar el silenciamiento de *Esr2*. Los resultados obtenidos mediante Western blot demostraron que la reducción de la proteína ER β fue máxima a las 24 horas tras la transfección, mientras que a las 48 y 72 horas los niveles proteicos tendían a recuperarse progresivamente hasta aproximarse a los observados en las células control. Estos hallazgos sugieren que el efecto del siRNA utilizado es transitorio y que las células

recuperan gradualmente la expresión del receptor. Esta observación también puede atribuirse al propio efecto de dilución como consecuencia de la proliferación celular. Por este motivo, el tiempo postransfección de 24 horas fue seleccionado como la condición óptima para los experimentos posteriores. El silenciamiento de *Esr2* constituye un proceso técnicamente complejo debido a la baja expresión basal de este gen en numerosos modelos celulares, la persistencia de la proteína ER β tras la degradación de su ARNm y las dificultades asociadas a la detección específica del receptor mediante anticuerpos validados. Estos factores pueden limitar la magnitud aparente del silenciamiento observado y dificultar su confirmación experimental [32, 42, 43].

La eficacia del silenciamiento fue posteriormente confirmada mediante RT-qPCR. La expresión de *Esr2* disminuyó tanto en condiciones basales de glucosa como tras la exposición a glucosa elevada, lo que demuestra la robustez del modelo experimental generado. Además, la ausencia de cambios significativos inducidos por la glucosa sobre los niveles de *Esr2* indica que las diferencias observadas se atribuyen específicamente a la acción del siRNA y no a modificaciones derivadas del tratamiento.

Una vez establecidas las condiciones experimentales óptimas analizamos la contribución de ER β al mantenimiento de la identidad de la célula- β pancreática. Para ello se evaluó la expresión de diversos factores de transcripción esenciales para la función y diferenciación de estas células: *Pdx1*, *Mafa* y *Nkx6.1*. Dichos factores, constituyen reguladores clave de la expresión de insulina y del mantenimiento del fenotipo de la célula- β pancreática [8].

Los resultados obtenidos muestran que el silenciamiento de *Esr2* provoca un aumento significativo de la expresión de *Pdx1* y *Mafa* cuando se analizan específicamente las condiciones basales de glucosa. Tanto *Pdx1* como *Mafa* son considerados factores maestros de la función β pancreática, siendo imprescindibles para mantener una adecuada capacidad secretora de insulina y una correcta respuesta frente a la glucosa [8, 11].

Por el contrario, aunque *Nkx6.1* mostró una tendencia a aumentar tras el silenciamiento, las diferencias no alcanzaron significación estadística. Este resultado podría indicar que la regulación de este factor de transcripción es menos dependiente de ER β o que los cambios inducidos requieren periodos de silenciamiento más prolongados para hacerse evidentes. Asimismo, no puede descartarse que el reducido

tamaño muestral empleado en este estudio haya limitado la capacidad para detectar diferencias de mayor magnitud.

Además, se observa la inducción de *Mafa* en las células control tratadas con altas concentraciones de glucosa. Esto puede deberse a que la glucosa estimula la expresión de *Mafa* para aumentar la capacidad secreción de insulina en respuesta a esa elevación de la glucosa. Por tanto, el incremento de *Mafa* podría reflejar un mecanismo compensatorio para responder a la mayor demanda metabólica.

El silenciamiento de ER β provocó una reducción significativa de la expresión de *Ins1* en condiciones basales. Estos resultados sugieren que ER β contribuye al mantenimiento de la expresión basal de *Ins1* en la célula- β pancreática. Sin embargo, este efecto no fue detectado al considerar conjuntamente todos los grupos experimentales, lo que indica que la influencia de ER β sobre la expresión de *Ins1* es más evidente en condiciones basales de glucosa y en ausencia de glucotoxicidad. Aunque estos hallazgos podrían parecer contradictorios, es posible que reflejen la activación de mecanismos compensatorios destinados a preservar la función celular tras la pérdida de señalización mediada por ER β . En este contexto, el incremento de *Mafa* y *Pdx1* podría interpretarse como una respuesta adaptativa encaminada a mantener la identidad de la célula- β frente a una situación de estrés. No obstante, dicha respuesta compensatoria podría no ser suficiente para sostener la expresión de *Ins1*, especialmente si ER β participa de forma más directa en la regulación de genes implicados en la síntesis o procesamiento de insulina. Otra posibilidad es la existencia de mecanismos de retroalimentación negativa. La disminución de la expresión de insulina podría desencadenar una regulación compensatoria al alza de factores de transcripción como *Mafa* y *Pdx1*, con el objetivo de restaurar la capacidad biosintética de la célula. En este escenario, el aumento de *Mafa* y *Pdx1* sería una consecuencia de la reducción de *Ins1* y no necesariamente la causa de un incremento de su expresión.

Asimismo, debe considerarse que los niveles de ARNm no siempre se correlacionan directamente con la actividad funcional de las proteínas correspondientes. Por tanto, el aumento observado en la expresión génica de *Mafa* y *Pdx1* podría no traducirse en un incremento equivalente de sus niveles proteicos o de su actividad transcripcional, limitando su capacidad para inducir la expresión de *Ins1*.

Por otra parte, se analizó si la ausencia de ER β modificaba la respuesta celular frente a condiciones de glucotoxicidad. La exposición a concentraciones elevadas de glucosa constituye un modelo ampliamente utilizado para estudiar fenómenos de estrés metabólico y estrés del retículo endoplasmático en la célula- β . Con este objetivo se evaluó la expresión de los genes *Hspa5* (BiP) y *Ddit3* (CHOP), dos marcadores clásicos de activación de la respuesta por estrés del retículo [15, 16, 44].

Los resultados obtenidos no mostraron modificaciones significativas en la expresión de ninguno de los genes tras el silenciamiento de ER β ni tras el tratamiento con glucosa elevada. Únicamente, se observó una reducción significativa en la expresión génica de *Ddit3* en las células transfectadas con siER β y sometidas a 25 mM de glucosa, en comparación con el grupo siCtrl mantenido en condiciones basales (11 mM de glucosa). No obstante, esta comparación combina simultáneamente dos variables distintas, el silenciamiento de ER β y la concentración elevada de glucosa, lo que limita su interpretación biológica y no permite atribuir el efecto observado específicamente a ER β ni a la glucotoxicidad. En conjunto, los resultados muestran que ninguno de los tratamientos aplicados generó cambios significativos en la expresión de los marcadores de estrés del retículo endoplásmico evaluados, ya que numerosos estudios describen una inducción de *Ddit3* en situaciones de estrés del retículo endoplasmático prolongado [16, 44]. Una posible explicación es que las condiciones experimentales empleadas, particularmente la duración relativamente corta de la exposición a glucosa (6 horas), reflejen una fase temprana de adaptación celular en la que todavía no se ha producido una activación robusta de las vías proapoptóticas dependientes de CHOP. Alternativamente, ER β podría participar en mecanismos reguladores de la respuesta al estrés cuya ausencia modifique la dinámica temporal de expresión de este gen [16, 44]. Otros estudios han demostrado la alteración en la expresión de proteínas relacionadas con estrés de retículo endoplasmático cuando el tratamiento a altas concentraciones de glucosa se mantiene durante 24 horas [45]. Además, también encontramos otros trabajos que donde se observa el aumento en la expresión de la proteína CHOP cuando el tratamiento con glucosa se da a concentraciones más altas y se mantiene durante 48 horas [46].

A pesar de que los resultados obtenidos sugieren una participación de ER β en el mantenimiento de la identidad β pancreática, este estudio presenta algunas

limitaciones. En primer lugar, los experimentos se realizaron en una única línea celular inmortalizada, por lo que será necesario confirmar estos hallazgos en otras líneas celulares o en islotes pancreáticos primarios de modelos animales. Además, la evaluación realizada en este estudio se centró en cambios en la expresión génica, sin abordar de forma directa las consecuencias funcionales derivadas del silenciamiento de ER β . Aunque las modificaciones observadas en la expresión de genes relacionados con la identidad y función de la célula- β aportan información valiosa sobre los mecanismos moleculares implicados, no permiten determinar por sí solas si estos cambios se traducen en alteraciones fisiológicamente relevantes. En este sentido, habría sido de especial interés complementar los resultados con ensayos funcionales, como la determinación de la secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS), considerada uno de los principales indicadores de la funcionalidad de las células- β pancreáticas. Este tipo de aproximación permitiría establecer una relación más directa entre los cambios transcripcionales observados y la capacidad secretora de las células.

Por otro lado, el estudio del estrés de retículo endoplásmico podría ampliarse mediante la evaluación de un panel más amplio de marcadores implicados en las distintas ramas de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, por las siglas en inglés: “*Unfolded Protein Response*”), ya que los genes analizados representan únicamente una parte de esta compleja red de señalización. Asimismo, la utilización de tiempos de exposición más prolongados y de diferentes concentraciones de glucosa permitiría caracterizar con mayor precisión la evolución temporal y la intensidad de la respuesta celular frente a la glucotoxicidad. Es posible que los cambios inducidos por la exposición crónica a glucosa elevada requieran periodos más largos para manifestarse a nivel transcripcional, proteico o funcional, por lo que futuros estudios deberían considerar diseños experimentales que contemplen tanto distintas dosis como diferentes tiempos de tratamiento.

En conclusión, los resultados obtenidos indican que ER β desempeña un papel relevante en el mantenimiento de la identidad molecular de la célula- β pancreática. El aumento en la expresión de los factores de transcripción *Mafa* y *Pdx1* sumado a la disminución en los niveles del gen de la insulina con el silenciamiento de *Esr2*, apoyan la existencia de una función reguladora de este receptor sobre el programa de identidad y función de la célula- β . Por el contrario, su participación en la respuesta temprana al estrés

inducido por glucosa elevada requiere estudios adicionales que permitan esclarecer los mecanismos implicados. En conjunto, este trabajo aporta nuevas evidencias sobre la importancia de ER β en la biología de la célula- β pancreática y refuerza el interés de esta vía como posible diana terapéutica en patologías asociadas a la disfunción β , como la diabetes mellitus tipo 2.

6. Conclusiones y proyección futura

Por lo tanto, estas son las conclusiones derivadas del presente trabajo:

- 1- EL anticuerpo Invitrogene Cat# MA5-248077 (Clon PPZ0506) demostró ser el más adecuado para la detección de los niveles de la proteína ER β y su análisis mediante Western blot en células INS-1E.
- 2- El silenciamiento de *Esr2* mediante siRNA resultó exitoso, alcanzando su máxima efectividad a las 24 horas desde la última transfección.
- 3- El silenciamiento de ER β produjo un aumento significativo de los niveles de expresión de *Mafa*, *Pdx1* y una disminución en los niveles de expresión *Ins1* en condiciones basales de glucosa, sugiriendo que este receptor participa en el mantenimiento de la identidad molecular de la célula- β pancreática

Los resultados obtenidos en este trabajo aportan nuevas evidencias sobre la implicación de ER β en el mantenimiento de la identidad de la célula- β pancreática. No obstante, son necesarios estudios adicionales que permitan profundizar en los mecanismos moleculares responsables de los cambios observados en la expresión de genes clave como *Pdx1*, *Mafa* e *Ins1*, así como sus efectos sobre la funcionalidad.

Como líneas futuras de investigación, sería necesario ampliar el análisis de los marcadores de estrés del retículo endoplásmico mediante el estudio de otros genes implicados en la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR), así como validar a nivel proteico las alteraciones observadas en la expresión génica. Además, resultaría de interés realizar estudios funcionales, especialmente de secreción de insulina estimulada por glucosa, para determinar el impacto biológico del silenciamiento de ER β en la célula- β pancreática. Finalmente, la confirmación de estos hallazgos en modelos más próximos a la fisiología pancreática, como islotes pancreáticos primarios o modelos animales, permitiría establecer su relevancia fisiológica y valorar el potencial de ER β como posible diana terapéutica en la diabetes mellitus tipo 2.

7. Bibliografía

1. LeRoith D. β -cell dysfunction and insulin resistance in type 2 diabetes: role of metabolic and genetic abnormalities. *The American Journal of Medicine*, 113(6) 3-11 (2002).
2. Ong et al. Global, regional, and national burden of diabetes from 1990 to 2021, with projections of prevalence to 2050: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 202. *The Lancet*, 402(10397) 203-234 (2023).
3. *Los Datos y Cifras Sobre La Diabetes Ponon de Manifiesto Su Impacto a Nivel Mundial En Las Personas, Las Familias y Los Países.*
4. Ong et al. Global, regional, and national burden of diabetes from 1990 to 2021, with projections of prevalence to 2050: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *Lancet (London, England)*, 402(10397) 203 (2023).
5. Da Silva Xavier. The Cells of the Islets of Langerhans. *Journal of Clinical Medicine* 2018, Vol. 7, Page 54 (2018).
6. Islets of Langerhans, an Overview. *ScienceDirect Topics* (2015).
7. Soriano et al. Regulation of KATP channel by 17β -estradiol in pancreatic β -cells. *Steroids*, 76(9) 856-860 (2011).
8. Marchetti et al. Pancreatic Beta Cell Identity in Humans and the Role of Type 2 Diabetes. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (2017).
9. Lewis et al. A Receptor Story: Insulin Resistance Pathophysiology and Physiologic Insulin Resensitization's Role as a Treatment Modality. *International Journal of Molecular Sciences* 24(13) (2023).
10. Usher & Showalter Biophysical insights into glucose-dependent transcriptional regulation by PDX1. *The Journal of Biological Chemistry* 298(12) 102623 (2022).
11. Remedi & Emfinger. Pancreatic β -Cell Identity in Diabetes. *Diabetes, obesity & metabolism* 18(Suppl 1) 110 (2016).
12. Pavluch et al. Deficiency of transcription factor Nkx6.1 does not prevent insulin secretion in INS-1E cells. *Scientific Reports* 13(1) 683 (2023).
13. Guo et al. Inactivation of specific β cell transcription factors in type 2 diabetes. *The Journal of Clinical Investigation* 123(8) 3305 (2013).
14. Kang et al. UPRmt and coordinated UPRER in type 2 diabetes. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 10 974083 (2022).
15. Laybutt D et al. Endoplasmic reticulum stress contributes to beta cell apoptosis in type 2 diabetes. *Diabetologia* 50(4) 752-763 (2007).
16. Oyadomari S et al. Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes. *The Journal of Clinical Investigation* 109(4) 525-532 (2002).
17. Nelson & Bulun. Estrogen production and action. *Journal of the American Academy of Dermatology* 45(3) S116-S124 (2001).
18. Simpson et al. Aromatase - A brief overview. *Annual Review of Physiology* 64(Volume 64, 2002) 93-127 (2002).

19. Alonso-Magdalena P et al. Bisphenol-A acts as a potent estrogen via non-classical estrogen triggered pathways. *Molecular and Cellular Endocrinology* 355(2) 201-207 (2012).
20. Mauvais-Jarvis et al. The Role of Estrogens in Control of Energy Balance and Glucose Homeostasis. *Endocrine Reviews* 34(3) 309 (2013).
21. Heldring N et al. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiological reviews* 87(3) 905-931(2007).
22. De Paoli M et al. The Role of Estrogen in Insulin Resistance: A Review of Clinical and Preclinical Data. *American Journal of Pathology* 191(9) 1490-1498 (2021).
23. Yazdkhasti M et al. The association between age of menopause and type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Nutrition & metabolism* 21(1) (2024).
24. Revankar C et al. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science (New York, N.Y.)* 307(5715) 1625-1630 (2005).
25. Ropero A et al. The role of estrogen receptors in the control of energy and glucose homeostasis. *Steroids* 73(9-10) 874-879 (2008).
26. Gustafsson J. Estrogen receptor beta--a new dimension in estrogen mechanism of action. *The Journal of endocrinology* 163(3) 379-383 (1999).
27. Mendelsohn & Karas. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *The New England journal of medicine* 340(23) 1801-1811 (1999).
28. McEwen B et al. Estrogen effects on the brain: actions beyond the hypothalamus via novel mechanisms. *Behavioral neuroscience* 126(1) 4-16 (2012).
29. Heldring N et al. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiological reviews* 87(3) 905-931 (2007).
30. Nadal A et al. Role of estrogen receptors alpha, beta and GPER1/GPR30 in pancreatic beta-cells. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* 16(1) 251-260 (2011).
31. Nilsson et al. Mechanisms of estrogen action. *Physiological reviews* 81(4) 1535-1565 (2001).
32. Nelson A et al. Comprehensive assessment of estrogen receptor beta antibodies in cancer cell line models and tissue reveals critical limitations in reagent specificity. *Molecular and Cellular Endocrinology* 440 138-150 (2017).
33. Zhao C et al. Estrogen receptor β : an overview and update. *Nuclear Receptor Signaling* 6 e003 (2008).
34. Rody A et al. Methylation of estrogen receptor beta promoter correlates with loss of ER-beta expression in mammary carcinoma and is an early indication marker in premalignant lesions. *Endocrine-related cancer* 12(4) 903-916 (2005).
35. Chen J et al. Calycosin induces apoptosis by the regulation of ER β /miR-17 signaling pathway in human colorectal cancer cells. *Food & function* 6(9) 3091-3097 (2015).

36. Božović A et al. Estrogen Receptor Beta: The Promising Biomarker and Potential Target in Metastases. *International journal of molecular sciences* 22(4) 1-24 (2021)
37. Liao T et al. Estrogen receptor- β in mitochondria: implications for mitochondrial bioenergetics and tumorigenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1350(1) 52-60 (2015).
38. Alonso-Magdalena P et al. Antidiabetic actions of an estrogen receptor β selective agonist. *Diabetes* 62(6) 2015-2025 (2013).
39. Asfari M et al. Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology* 130(1) 167-178 (1992).
40. Špaček T et al. Glucose-stimulated insulin secretion of insulinoma INS-1E cells is associated with elevation of both respiration and mitochondrial membrane potential. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* (2008) 40(8) 1522-1535 (2008).
41. Gillespie. Type-1 Diabetes. 1433 (2016).
42. Badreldin A et al. Relative mRNA and protein stability of epigenetic regulators in musculoskeletal cell culture models. *Gene* 766 145032 (2021).
43. Vladusic E et al. Expression and regulation of estrogen receptor β in human breast tumors and cell lines. *Oncology reports* 7(1) 157-167 (2000).
44. Szegezdi E et al. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Reports* (2006) 7(9) 880 (2006).
45. Maris M et al. High Glucose Induces Dysfunction in Insulin Secretory Cells by Different Pathways: A Proteomic Approach. *Journal of Proteome Research* 9(12) 6274-6287 (2010).
46. Broca C et al. Proteasome dysfunction mediates high glucose-induced apoptosis in rodent beta cells and human islets. *PloS one* 9 (3) (2014).