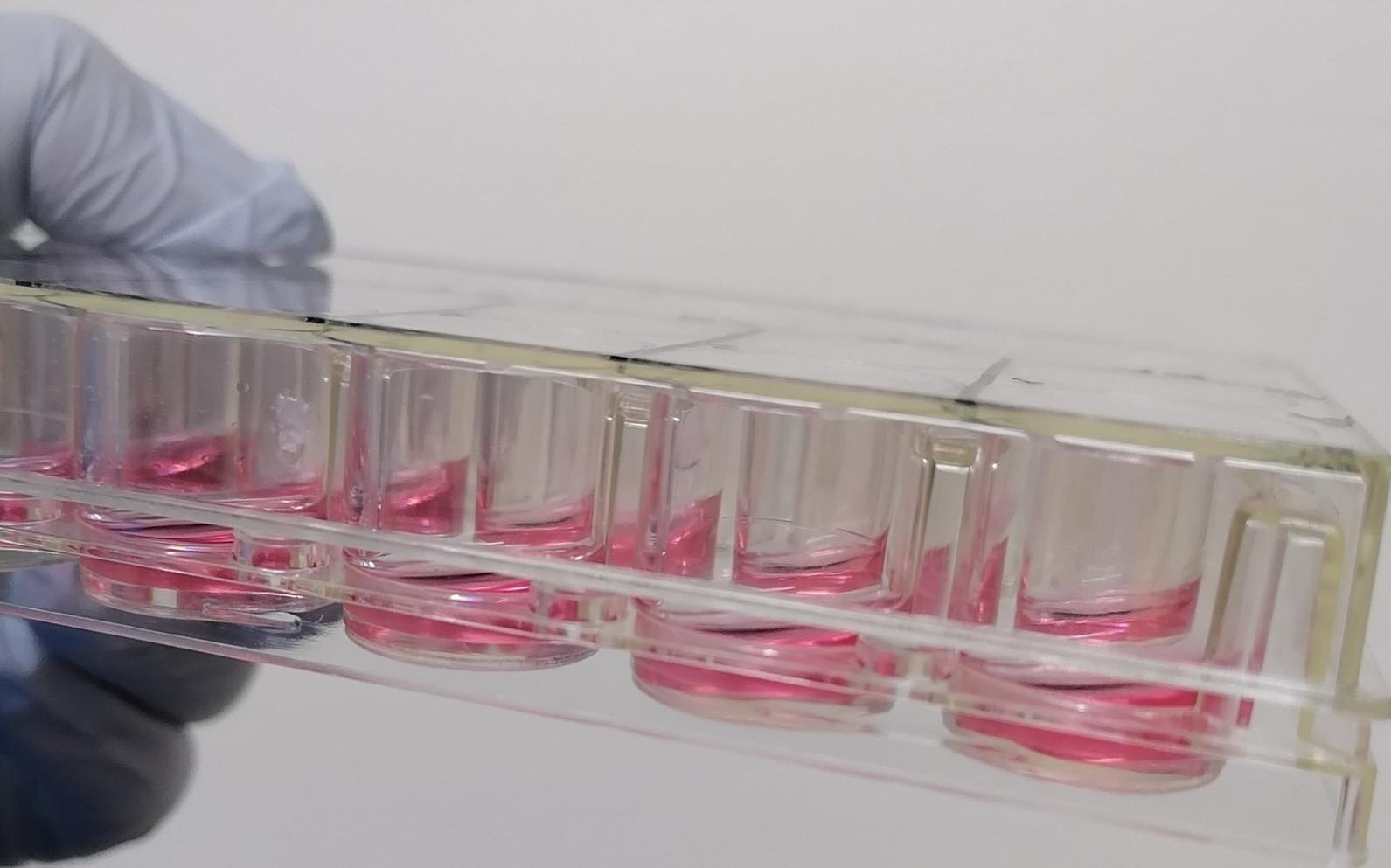


---

# Regulación nutricional de la expresión de Dec1 en células $\beta$ pancreáticas

---

Miriam Israeli Galicia Silva



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ciencias y Humanidades



## Regulación nutricional de la expresión de Dec1 en células $\beta$ pancreáticas

Trabajo de graduación en modalidad de Tesis presentado por  
Miriam Israeli Galicia Silva  
para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y  
Microbiología

Guatemala  
2022



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ciencias y Humanidades



## Regulación nutricional de la expresión de Dec1 en células $\beta$ pancreáticas

Trabajo de graduación en modalidad de Tesis presentado por  
Miriam Israeli Galicia Silva  
para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y  
Microbiología

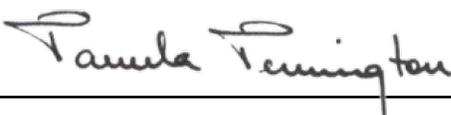
Guatemala  
2022

Vo.Bo.:

(f)   
\_\_\_\_\_  
Juan Alvarez Dominguez, Ph.D.

Tribunal Examinador:

(f)   
\_\_\_\_\_  
Juan Alvarez Dominguez, Ph.D.

(f)   
\_\_\_\_\_  
Pamela Pennington, Ph.D.

(f)   
\_\_\_\_\_  
Diego Archila, Ph.D.

Fecha de aprobación: Guatemala, 14 de Enero de 2022.

Isra inició este camino sin un rumbo establecido, solo con una pequeña noción de querer (algún día) ser parte de ese *proyecto* o *descubrimiento* que mejoraría la calidad de vida de alguien con alguna enfermedad. Luego de 3 años, así como su familia seguía sin saber qué estudiaba "la niña", la niña seguía sin un rumbo definido. Fue hasta que la medicina regenerativa y las células madre se cruzaron en su camino, que ella lo supo. Luego de congresos, charlas, TEDTalks y varios artículos ya sabía que ese tema tan "chilero" era con el que quería terminar este capítulo y continuar el próximo. Y sí, todos sabemos que aún queda mucho más por conocer y aprender ya que este es solo el inicio (un pasito de bebé). Pero si de algo estamos seguros es que Isra quiere seguir aprendiendo (y sí, esto incluye el seguir cometiendo errores para aprender de ellos).

*(Regresando a primera persona)*

Este trabajo de graduación no podría haber sido posible de no ser por la ayuda y acompañamiento de muchas personas y organizaciones dentro y fuera de Guatemala, cuya comunicación y ayuda pudieron superar incluso las barreras y dificultades de una pandemia. Por lo que tomaré este espacio para agradecer de la forma más sincera a:

Mi asesor y mentor Dr. Juan Alvarez Dominguez. Que durante todo el proceso de planteamiento, desarrollo, experimentación, resolución de problemas y finalización de este trabajo no se limitó únicamente a corregir, sino que se extendió a enseñar, animar, estar presente, alentar y retroalimentar siempre con una sonrisa en el rostro incluso en horarios y días fuera de lo común. Quien además, por medio del *Harvard Stem Cell Institute* (HSCI), donó la línea celular y algunos de los reactivos y suministros utilizados dentro de este proyecto.

Dra. Pamela Pennington por la confianza, fe y apoyo que le tuvo al proyecto desde el principio, como también su constante supervisión y disponibilidad para apoyarme en todo momento.

MSc. Yunuen Soto por tomarse el tiempo de enseñarme y apoyarme durante todo el proceso experimental.

Licda. Nely Marroquín por el préstamo de reactivos y Licda. Christa Contreras por el apoyo durante el proceso de cotización y compras de los materiales y suministros.

El Centro de estudios en Salud (CES) y el Centro de Estudios en Biotecnología (CEB) por el préstamo y la confianza en dejarme usar sus instalaciones, equipo, suministros y reactivos.

La Universidad del Valle de Guatemala por colocar en mi camino catedráticas y catedráticos de los que aprendí mucho, pero aún más importante, catedráticas que vieron en mí el potencial y siempre estuvieron presentes para alentarme a seguir adelante y a seguir mis sueños, aunque fuera *Isra* y una tesis con cultivo celular mamífero se viera muy difícil de lograr y más con una pandemia de por medio.

Mis amigos quienes con un café, un helado, una sonrisa, una oración, un zoom, un Tiktok o incluso un mensaje de Instagram estuvieron presentes durante todo el proceso. Desde Corea, Estados Unidos, pasando por la capital y llegando hasta el Puerto. En el laboratorio trabajando, llorando, comiendo papitas o bailando, pero siempre me ayudaron.

Miss Silvia, miss Ana María y miss Brenda quienes me ayudaron a descubrir el amor que le tengo a la ciencia.

A mi familia, quienes sin importar la distancia y mi poca disponibilidad estuvieron presentes y apoyándome en todo momento. Mostrándome su amor y apoyo incondicional con comida, abrigo, posada, un mensaje, un sticker, abrazos - *incluyendo los a "regañadientes" de alguien a la que no le gustan* - o incluso una palmada en la cabeza.

A Dios porque mi abuela siempre estuvo en primera fila pidiéndole porque me fuera bien y gracias a eso aquí estoy.

Y a los que ya no están, pero que confiaron en mí antes de que yo empezara a hacerlo.

Como nota final, quiero dedicarle el siguiente trabajo a mi monstruo Camila (Tamila), quien me anima a crecer y vivir cada día con café, canciones, abrazos y *micotondrias*.

- *Que sepa el mundo que en marcha estoy* -

<b>Prefacio</b>	IV
<b>Lista de figuras</b>	VII
<b>Lista de cuadros</b>	VIII
<b>Resumen</b>	IX
<b>Abstract</b>	X
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2. Objetivos</b>	<b>3</b>
2.1. Objetivo general	3
2.2. Objetivos específicos	3
<b>3. Justificación</b>	<b>4</b>
<b>4. Marco teórico</b>	<b>6</b>
4.1. Diabetes	6
4.1.1. Importancia	6
4.1.2. Características de la enfermedad	7
4.1.3. Clasificación: Diabetes tipo 1 y 2	7
4.1.4. Tratamientos para la diabetes	8
4.2. Maduración de islotes pancreáticos	8
4.2.1. Avances y limitaciones para la generación de islotes	8
4.2.2. Islotes inmaduros y maduros	9
<b>5. Metodología</b>	<b>13</b>
5.1. Hipótesis	13
5.2. Diagrama	13
5.3. Materiales y métodos	13
5.3.1. Medidas de bioseguridad y mantenimiento de condiciones asépticas	13
5.3.2. Mantenimiento de células	14
5.3.3. Tratamiento estable y transitorio	18
5.3.4. Extracción de ARN	19
5.3.5. Síntesis de ADNc	21
5.3.6. Preparación de <i>primers</i>	22

5.3.7. PCR en tiempo real	23
5.3.8. Análisis de resultados	25
<b>6. Resultados</b>	<b>28</b>
6.1. Establecimiento de la línea celular	28
6.2. Análisis de expresión génica	28
<b>7. Análisis de resultados</b>	<b>36</b>
7.1. Establecimiento de la línea celular	36
7.2. Análisis de expresión génica	37
<b>8. Conclusiones</b>	<b>42</b>
<b>9. Recomendaciones</b>	<b>43</b>
<b>10. Referencias</b>	<b>44</b>
<b>I</b>	
<b>Lista de figuras de anexos</b>	<b>XI</b>
<b>Lista de cuadros de anexos</b>	<b>XII</b>
<b>11. Anexos</b>	<b>51</b>

---

Lista de figuras

---

1. Tasa de mortalidad a causa de <i>diabetes Mellitus</i> del 2008-2016 en Guatemala dado en porcentaje (%).	7
2. Estructura del páncreas, distribución, nombre y función de las células que conforman los Islotes de Langerhans.	10
3. Interacción entre mTORC1 y TFEB.	11
4. Expresión de Dec1 y Dec2 en células Alfa ( $\alpha$ ) y Beta ( $\beta$ ) fetales y adultas.	12
5. Diagrama del flujo que se siguió durante el proceso de experimentación.	14
6. Beta-TC-6 ATCC® CRL11506™ de <i>Mus musculus</i> .	15
7. Cámara de Neubauer o Hemocitómetro.	17
8. Flujo de trabajo para el pasaje y división de las células al momento de su llegada.	18
9. Diagrama de concentración de glucosa de los distintos tratamientos.	20
10. Diagrama de distribución de los pozos y los tratamientos a los que serán sometidas las células por 3 días.	21
11. Mapa de la placa de 96 pozos para el PCR tiempo real para todos los tratamientos y genes.	24
12. Diagrama de decisiones para el análisis de comparación de promedios por medio de R, comparando 2 niveles	27
13. Crecimiento y visualización de las células en un microscopio invertido en objetivo 10x ampliadas a 40x.	29
14. Tasa de crecimiento de las células Beta-TC-6 durante 3 semanas.	29
15. Validación de productos del PCR en tiempo real de retrotranscripción.	30
16. Validación de la concentración de Glucosa en los medios para los distintos tratamientos.	31
17. Diagrama de caja y bigotes de la expresión relativa de los genes Arntl, Dec1, Myc, Nr1d1 y Per1 de los tratamientos estables.	32
18. Diagrama de caja y bigotes de la expresión relativa de los genes Arntl, Dec1, Myc, Nr1d1 y Per1 de los tratamientos transitorios.	33
19. Gráfica de barras a escala log2 de la expresión relativa en las réplicas del tratamiento glucosa estable 20 mM.	34
20. Gráfica de barras a escala log2 de la expresión relativa en las réplicas del tratamiento glucosa estable 8 mM.	35

---

Lista de cuadros

---

1. Mezcla de ARN y oligos para una reacción de síntesis de ADNc. . . . .	22
2. Componentes del Master Mix para la síntesis del ADNc. . . . .	22
3. Programa de termociclador para la síntesis de la primera hebra. . . . .	22
4. Lista y descripción de <i>primers</i> a utilizar dentro del PCR tiempo real de retrotrans- cripción. . . . .	23
5. Componentes del Master Mix para PCR tiempo real. . . . .	24
6. Programa del termociclador tiempo real para evaluación de expresión génica por PCR tiempo real. . . . .	25

La diabetes es una enfermedad de gran relevancia a nivel mundial. Actualmente se está trabajando en la generación de islotes pancreáticos, a partir de células madre pluripotentes, como una estrategia para el tratamiento de diabetes dependiente de insulina. Sin embargo, aún se necesitan determinar los mecanismos moleculares por los que estos islotes adquieren su madurez funcional. Estudios han relacionado este proceso de maduración con la adaptación a cambios nutricionales postnatales resaltando cierta relevancia de Dec1, factor de transcripción modulador del reloj circadiano. Por lo tanto, en este estudio se planteó el establecimiento de una línea celular de células  $\beta$  de ratón para el análisis de la expresión génica de Dec1 y otros genes circadianos en respuesta a diferentes condiciones nutricionales, con el fin de confirmar si existe una correspondencia entre su expresión y el estado nutricional. La línea Beta-TC-6 se estableció exitosamente, observando una tendencia de aumento en la expresión de Dec1 en respuesta a un ayuno prolongado, simulado al decrecer de forma estable la concentración de glucosa en el medio de 25 mM a 8 mM. Lo cual coincide con nuestra hipótesis: en condiciones de ayuno, la actividad del complejo mTORC1 es suprimida, cambio que permite la translocación de TFEB al núcleo, donde promueve la expresión de Dec1. Además, en respuesta al tratamiento estable de glucosa 20 mM, se observó un comportamiento antifásico de los genes circadianos Arntl, Per1 y Nr1d1, sugiriendo el inicio potencial de la sincronización del reloj circadiano en estas células. Esto abre oportunidades de investigación con este modelo celular dentro de la Universidad del Valle de Guatemala.

Diabetes is a disease of worldwide relevance. Currently, as a strategy for treating insulin-dependent diabetes, much effort has been put into generating pancreatic islets from pluripotent stem cells. However, the molecular mechanisms by which these islets reach functional maturity are still unknown. Studies have linked the islet maturation process with adaptation to postnatal nutritional changes, highlighting a role for Dec1, a transcription factor that modulates the circadian clock. Thus, in this study we propose establishing a mouse pancreatic  $\beta$  cell line to analyze the expression of Dec1 and other circadian genes in response to varying nutritional conditions, in order to investigate whether there is a correspondence between their expression and nutritional state. The Beta-TC-6 line was successfully established, and a trend of increased Dec1 expression was observed in response to prolonged fasting, simulated by stably decreasing the media glucose concentration from 25 mM to 8mM. Which coincides with our hypothesis: under fasting conditions, the activity of the mTORC1 complex is suppressed, change that allows the translocation of TFEB to the nucleus, where it promotes the expression of Dec1. Furthermore, in response to a stable 20 mM glucose treatment, antiphase expression of the circadian genes Arntl, Per1 and Nr1d1 was observed, suggesting the potential initiation of circadian clock synchronization in these cells. These findings open the door to research opportunities with this cellular model at Universidad del Valle de Guatemala.

La diabetes es una enfermedad crónica caracterizada por glucosa alta en sangre, o hiperglicemia. Puede ser dividida en tipo 1, donde las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos son destruidas por una respuesta autoinmune, o tipo 2, donde existe una deficiencia en su función asociada con mutaciones genéticas o con estresores externos como la obesidad, embarazo y/o resistencia a la insulina. Únicamente en el 2012 se reportaron 1.5 millones de muertes a causa de diabetes, y en el 2021 se diagnosticaron 537 millones de adultos con esta enfermedad al rededor del mundo ((WHO) 2016; IDF, 2021). Para la diabetes tipo 1 existen varios tratamientos, incluyendo las inyecciones de insulina diarias y los trasplantes de islotes pancreáticos. Las inyecciones de insulina implican costos elevados e incomodidad para pacientes, además de riesgos de cetoacidosis u otras complicaciones al no ser administradas de la forma correcta (Warshauer, Bluestone, y Anderson, 2020). Además, al hablar de los trasplantes de islotes, la poca disponibilidad de donadores de islotes, y el bajo funcionamiento de los disponibles, ha llevado a buscar nuevas soluciones (Bellin y cols., 2012; Rickels y Robertson, 2019). Una de ellas es generar islotes pancreáticos a partir de células madre humanas pluripotentes (hPSC) (Drew, 2021; Helman y Melton, 2021). Por lo tanto, el conocimiento de los procesos de diferenciación hacia las células de los islotes pancreáticos ha recibido mayor atención. Actualmente existen protocolos para la producción de islotes pancreáticos funcionales a partir de hPSC (Pagliuca y cols., 2014; Rezania y cols., 2014). Sin embargo, su funcionamiento no llega a igualarse al funcionamiento de islotes maduros en adultos (Nair, Tzanakakis, y Hebrok, 2020). Por lo tanto, resulta indispensable determinar a profundidad el proceso de maduración fisiológica de estos islotes.

Estudios del desarrollo de islotes pancreáticos humanos y de roedores han determinado que su maduración funcional representa una adaptación a cambios nutricionales postnatales. Las células  $\beta$  primero ganan la habilidad de secretar insulina en respuesta a glucosa, y luego esta aumenta de forma gradual en conjunto con el umbral de glucosa necesaria para su secreción (Salinno y cols., 2019). Aunque factores capaces de promover la maduración de islotes pancreáticos han sido descritos, sus mecanismos moleculares y sus desencadenantes fisiológicos aún no están claros. Por esta razón, se requiere más conocimiento de cómo estos islotes adquieren su fenotipo maduro para poder avanzar esfuerzos para frenar la pérdida de madurez en la diabetes, y para poder generar islotes pancreáticos maduros a partir de células madre con el fin de utilizarlas en terapias de trasplante.

En la actualidad se conoce que el reloj circadiano interno se sincroniza con los ritmos diurnos a través de señales como la luz y alimentación, preparando al organismo para la ejecución de funciones metabólicas (Panda, 2016). También se ha determinado que durante la maduración de los islotes pancreáticos, se encuentran involucrados varios genes relacionados al ciclo circadiano, a través de una

constante dinámica epigenética (Alvarez-Dominguez y cols., 2020). Un ejemplo de estos es Dec1, el cual es activado específicamente durante la maduración postnatal de las células  $\beta$  (Marcheva y cols., 2010; Rakshit y cols., 2018). Durante este periodo, existe un cambio nutricional, de alimentación constante a alimentación intermitente. Los islotes se adaptan a esta transición postnatal al cambiar mTORC1, quien actúa como un sensor nutricional, de activo a intermitentemente activo dependiendo de las fluctuaciones de nutrición-ayuno (Helman y cols., 2020). Estudios preliminares indican que este cambio adaptativo permite la translocación del factor de transcripción EB (TFEB) al núcleo, en donde activa a Dec1 entre otros genes. Dec1 se une a promotores/potenciadores de genes que codifican mediadores del aumento del umbral de glucosa para la secreción de insulina. La pérdida de Dec1 específicamente en células  $\beta$  resulta en ratones diabéticos, debido a islotes fisiológicamente inmaduros (Alvarez-Dominguez, Comunicación Personal).

Por esta razón, nuestra hipótesis es: bajo condiciones de ayuno, la actividad del complejo mTORC1 es reprimida, cambio que permite la translocación de TFEB al núcleo, donde activa a DEC1, quien a su vez induce y establece el control circadiano de genes clave para producir una función madura de insulina.

### 2.1. Objetivo general

Determinar si existe una diferencia en la expresión de Dec1 en células  $\beta$  de islotes pancreáticos en respuesta al estado nutricional.

### 2.2. Objetivos específicos

1. Establecer la línea de células Beta-TC-6 dentro del laboratorio de Biología Celular de la Universidad del Valle de Guatemala.
2. Implementar un protocolo dinámico de “alimentación-ayuno” mediante transiciones estables y/o periódicas entre cultivos bajo niveles de glucosa fisiológicos y suprafisiológicos.
3. Examinar cambios en la transcripción de Dec1 en células Beta-TC-6 sometidas a las distintas transiciones entre estados nutricionales.

La diabetes es una enfermedad crónica de gran relevancia a nivel mundial. Es caracterizada por alta azúcar en sangre (hiperglicemia) provocada por la destrucción autoinmune de las células  $\beta$  del páncreas o por el mal funcionamiento de estas debido a obesidad, estilo de vida, estresores externos como el embarazo y/o factores genéticos hereditarios (IDF, 2021; (WHO), 2016). El Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de Guatemala indicó que la prevalencia y la tasa de mortalidad por diabetes en Guatemala ha ido aumentando desde el 2006, donde esta última ha subido de 22% hasta alcanzar un 37% en el 2014 (Sam, 2016, 2019). Mientras que en el 2020 indicó que en el país el 30.1% de los hombres y el 26.9% de las mujeres padecían de diabetes (MSPAS, 2020). A nivel mundial únicamente en el 2012 se reportaron 1.5 millones de muertes a causa de diabetes, y en el 2021 se diagnosticaron 537 millones de adultos con esta enfermedad (IDF, 2021; (WHO), 2016).

Debido a que la diabetes tipo 1 no puede prevenirse, se ha buscado mejorar la calidad de vida de las personas que la sufren, sin embargo los tratamientos actuales que incluyen inyecciones de insulina diaria o incluso el trasplante de islotes pancreáticos provocan varias complicaciones adicionales a la salud de los pacientes (Warshauer y cols., 2020). A causa de estas complicaciones, una de las estrategias de reemplazo de islotes que actualmente se está llevando a cabo es la generación de islotes pancreáticos a partir de células pluripotentes humanas, pero los protocolos existentes para esta generación (Rezania y cols., 2014; Pagliuca y cols., 2014) producen islotes inmaduros cuyas células  $\beta$  se asemejan a las células  $\beta$  neonatales, ya que cuentan con una capacidad de secreción de insulina y un umbral de glucosa para su secreción muy bajos, en comparación a la capacidad presentada por las células  $\beta$  de los islotes maduros (Blum y cols., 2012; Velazco-Cruz, Goedegebuure, y Millman, 2020). Debido a esto, esfuerzos más recientes radican en el mejoramiento de estos islotes con el fin de llegar a un estado fisiológico maduro.

Estudios del desarrollo de islotes pancreáticos humanos y de roedores indican que su maduración funcional representa una adaptación a cambios nutricionales postnatales (Salinno y cols., 2019). Durante este periodo ocurre un cambio nutricional, de alimentación constante a intermitente. Los islotes se adaptan a esta transición postnatal al cambiar mTORC1, quien actúa como un sensor nutricional, de activo a intermitentemente activo de acuerdo con las fluctuaciones de nutrición-ayuno (Helman y cols., 2020). Este cambio en mTORC1 permite la translocación del Factor de transcripción EB (TFEB) al núcleo (Pastore y cols., 2019). Esto a su vez activa al factor de transcripción Dec1, un modulador del reloj circadiano activado específicamente durante la maduración postnatal de las células  $\beta$  (Alvarez-Dominguez y cols., 2020). Luego, Dec1 se une a promotores/potenciadores de genes que codifican mediadores del aumento del umbral de glucosa para la secreción de insulina.

Esta importante función de Dec1 en la maduración de las células  $\beta$  se ha confirmado al observar que la pérdida específica de Dec1 en las células  $\beta$  resulta en ratones diabéticos debido a islotes fisiológicamente inmaduros (Alvarez-Dominguez, Comunicación Personal).

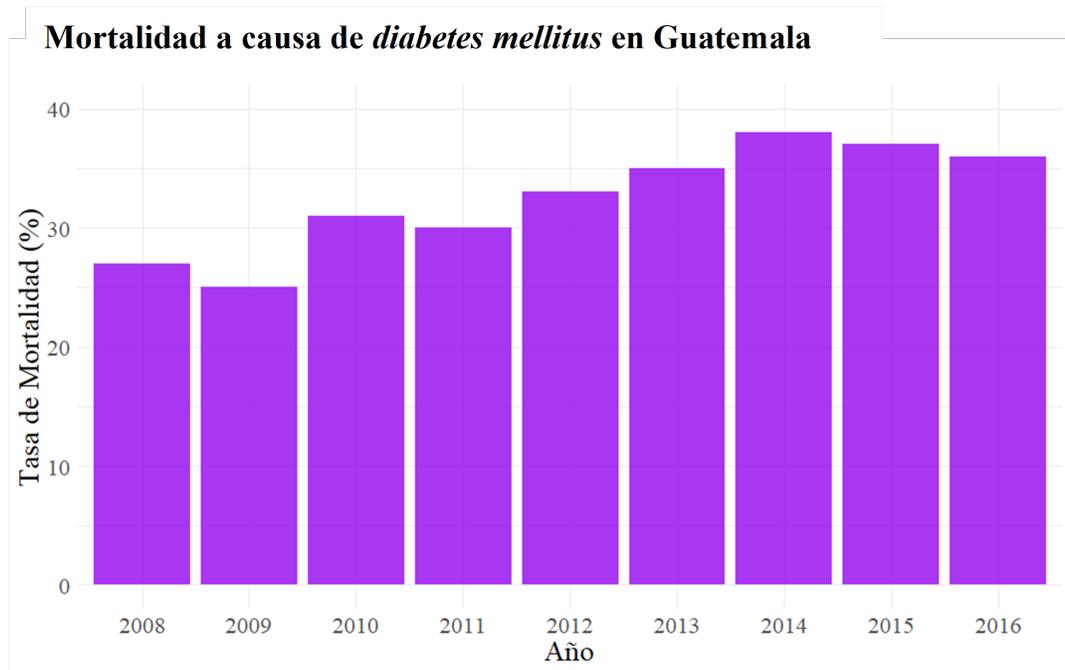
Esto nos lleva a realizar un análisis de expresión por PCR tiempo real de retrotranscripción de Dec1 y otros genes relacionados, con el fin de comprender cómo las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos adquieren su fenotipo maduro. En este estudio, sometemos una línea celular de células  $\beta$  de ratón a tratamientos de glucosa estables e intermitentes, con la finalidad de identificar si los cambios nutricionales tienen un efecto en la expresión de estos genes. Nuestra hipótesis es que, en condiciones de ayuno, la actividad del complejo mTORC1 es suprimida, permitiendo así la translocación de TFEB al núcleo donde activa a DEC1, quien a su vez induce y establece el control circadiano de genes para producir una respuesta madura de insulina en las células  $\beta$ .

## 4.1. Diabetes

### 4.1.1. Importancia

La diabetes es una enfermedad crónica severa de gran relevancia a nivel mundial. Esta enfermedad ha sido catalogada como una epidemia cuya prevalencia aumenta significativamente de forma alarmante, para el 2005 por cada dos personas diagnosticadas con diabetes, una persona padecía de la enfermedad sin saberlo (Bassett, 2005). Tan solo en el 2012, se reportó que 1.5 millones de muertes fueron a causa de diabetes, y en el 2021 que 537 millones de adultos vivían con esta enfermedad alrededor del mundo (IDF, 2021; (WHO), 2016). La prevalencia en Guatemala también ha ido en aumento, el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de Guatemala indicó en el Análisis de Enfermedades No Transmisibles del 2015 que tan solo en un año (2014-2015) los casos de *Diabetes mellitus* aumentaron en un 8% (MSPAS, 2015), para el el 2016 el país presentaba 505 casos por cada 100,000 habitantes (Sam, 2016). Solo en el 2020 en el país el 30.1% de los hombres y el 26.9% de las mujeres padecían de diabetes y aunque se ve una disminución en la prevalencia de la enfermedad, siendo esta similar a la del 2018, se considera que esto fue debido a que por la pandemia de COVID-19 la consulta externa estuvo cerrada y esto provocó una pérdida de información (MSPAS 2020; Sam, 2020). La tasa de mortalidad también ha ido aumentando desde el 2006 hasta alcanzar un 37% en el 2014 debido a falta de tratamiento (Figura 1) (Sam, 2019).

Figura 1: Tasa de mortalidad a causa de *diabetes Mellitus* del 2008-2016 en Guatemala dado en porcentaje (%).



Datos proporcionados por del Instituto Nacional de Estadística (INE) (Sam 2019).

#### 4.1.2. Características de la enfermedad

La diabetes se caracteriza por el alto nivel de azúcar en sangre, o hiperglicemia, dado a que el cuerpo no puede producir suficiente insulina o porque no puede utilizar la que produce (WHO 2016). La insulina es producida por las células  $\beta$  (Beta) de los islotes pancreáticos y es una de las hormonas más importantes para la regulación de glucosa sanguínea, junto al glucagón producido por las células  $\alpha$  (Alfa) de los islotes pancreáticos. La secreción de insulina ocurre con el fin de permitir el ingreso de la glucosa hacia la célula para producir energía, aunque también es importante para el metabolismo de grasas y proteínas (IDF 2021). La ingesta de alimentos eleva la insulina en circulación que estimula los receptores de insulina y promueve las rutas metabólicas del consumo de energía como la glicólisis (Lemaire, Thorrez, y Schuit 2016). La incapacidad de producir o utilizar insulina provocada por la diabetes causa la hiperglicemia, que al ser mal controlada a largo plazo puede causar el fallo de varios órganos, incrementando el riesgo de fallo renal, accidentes cerebrovasculares, amputaciones y ceguera, lo cual limita la calidad y esperanza de vida (Ashcroft y Rorsman 2012).

#### 4.1.3. Clasificación: Diabetes tipo 1 y 2

La diabetes puede ser clasificada en tipo 1 y tipo 2. La diabetes tipo 1 es causada por una respuesta autoinmune en donde el sistema inmunológico ataca a las células  $\beta$  pancreáticas, lo cual limita la producción de insulina. La diabetes tipo 1 puede ocurrir a cualquier edad, aunque en la mayoría de casos se manifiesta a partir de la niñez (IDF 2021). En cambio, en la diabetes tipo 2, el alto azúcar en sangre se debe a una incapacidad de la función de las células  $\beta$ , y es la más vista alrededor del mundo (Ashcroft y Rorsman 2012). La causa más común de la diabetes tipo 2 es la

obesidad, en la cual las células pancreáticas aumentan su producción de insulina para compensar por el exceso de azúcar sanguíneo, lo que puede eventualmente llevar al fallo de células sobrecargadas de trabajo (Reinehr, 2013). Otras causas del mal funcionamiento de las células  $\beta$  pueden ser mutaciones genéticas, o estresores externos como el embarazo y/o la resistencia a la insulina en tejido periférico independiente de obesidad ((WHO), 2016). Es importante mencionar que, aunque la diabetes tipo 2 es vista mayormente en adultos, se han incrementado los casos en niños y jóvenes, debido a la obesidad relacionada con la poca actividad física y la dieta inapropiada (Dabelea y cols., 2014).

#### 4.1.4. Tratamientos para la diabetes

La glucosa sanguínea juega un papel muy importante en el control y la prevención del desarrollo o progresión de la diabetes tipo 1 y 2. Muchas veces, sus niveles pueden ser manejados con suplementación de insulina o con medicamentos como la metformina ((WHO), 2016). La principal función de la metformina es disminuir la producción de glucosa por el hígado, reduciendo la glucemia en sangre en ayunas, sin embargo sus efectos secundarios pueden ser gastrointestinales o un posible aumento de acidosis láctica debido al aumento del lactato plasmático al inhibir la respiración mitocondrial en el hígado (DeFronzo, Fleming, Chen, y Bicsak, 2016; Nathan y cols., 2009). A diferencia de la diabetes tipo 1, la diabetes tipo 2 puede prevenirse reduciendo los factores que aumentan la predisposición a esta enfermedad, como el mantener una alimentación balanceada, aumentar la actividad física, y reducir el tejido adiposo, entre otros (Ashcroft y Rorsman, 2012). Para tratar la diabetes tipo 1 o tipo 2 cuando hay insuficiencia de insulina, es requerido el uso de inyecciones de esta de por vida, que además de incómodo para el paciente, produce un aumento en el riesgo de hipoglicemia fatal (Cryer, 2008). Es por esto que se han buscado otros métodos para tratar esta enfermedad, entre ellos el trasplante de islotes pancreáticos. El trasplante de islotes pancreáticos alogénicas ha probado tener muchos beneficios en el tratamiento de la diabetes tipo 1 (Rickels y Robertson, 2019). Pacientes que han recibido estos trasplantes han demostrado una disminución en la variabilidad en el control de la glucosa en sangre, eliminando el riesgo de hipoglicemia al establecer secreción de insulina interna (Latres, Finan, Greenstein, Kowalski, y Kieffer, 2019; Shapiro y cols., 2000). Sin embargo, entre los principales problemas está la pérdida de funcionalidad del trasplante luego de un corto tiempo que puede ser debido a que solo una porción de la masa de islotes sobrevive a al trasplante (Rickels y Robertson, 2019). Por otro lado, también su poca disponibilidad y su bajo funcionamiento a comparación con células pancreáticas saludables muestran un problema, además de que, por su procedencia alogénica, para su trasplante se necesita de un tratamiento con inmunosupresores para evitar su rechazo, pero el tratamiento prolongado con estos puede llegar a causar toxicidad u otras complicaciones en la salud de los pacientes (Bellin y cols., 2012; Rickels y Robertson, 2019).

## 4.2. Maduración de islotes pancreáticos

### 4.2.1. Avances y limitaciones para la generación de islotes

Debido a las limitaciones de los trasplantes cadavéricos, se han buscado otras fuentes de islotes para trasplantar (Helman y Melton, 2021; Sneddon y cols., 2018). A partir del primer aislamiento de las Células Madre Embrionarias humanas (hESCs) en 1998 (Thomson y cols., 1998), el descubrimiento de su capacidad de diferenciación *in vitro*, y la generación de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) en el 2006 (K. Takahashi y Yamanaka, 2006) ha iniciado una era moderna para la medicina regenerativa. Esta nueva era plantea generar tejidos y órganos a partir de células pluripotentes para su uso como trasplante autólogo o alogénico para reemplazar tejidos dañados por enfermedades, heridas, o envejecimiento (Eguizabal y cols., 2019). Actualmente ya existen protocolos capaces de generar islotes pancreáticos a partir de células pluripotentes (Millman y Pagliuca, 2017).

Sin embargo, las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos generados a partir de células pluripotentes se asemejan mayormente a las células  $\beta$  neonatales, las cuales son células inmaduras con una capacidad de secreción de insulina muy baja y con un umbral de glucosa reducido, a comparación las de islotes en adultos (Blum y cols., 2012; Velazco-Cruz y cols., 2020; Nair y cols., 2020). Es por esto que el interés actual está en comprender la maduración de los islotes pancreáticos.

#### 4.2.2. Islotes inmaduros y maduros

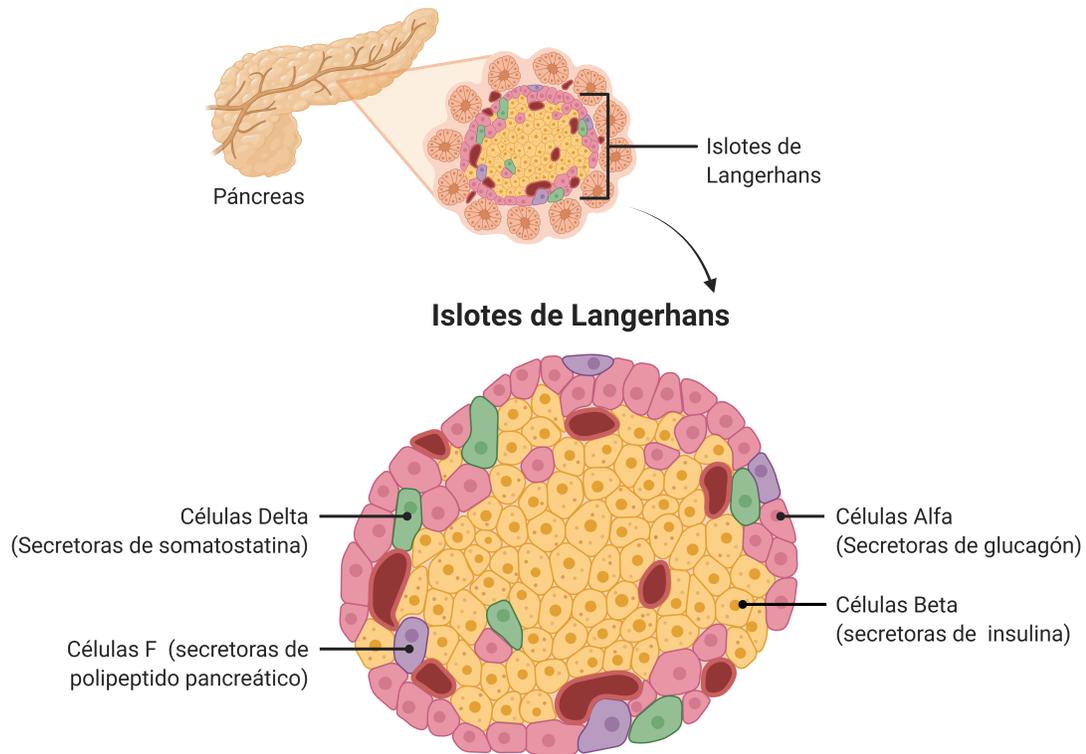
##### Anatómicamente:

El páncreas es una glándula proveniente del endodermo, puede dividirse en el páncreas exocrino cuyas células secretan enzimas al final de los conductos pancreáticos y el páncreas endocrino cuyas células secretoras de hormonas se encuentran agrupadas en los islotes de Langerhans: principalmente las células  $\alpha$  (Alfa) secretoras de glucagón, y las células  $\beta$  (Beta) secretoras de insulina, además de grupos pequeños de células  $\delta$  (Delta) liberadoras de somatostatina y células PP secretoras de polipéptido pancreático (Pan y Wright, 2011) (Figura 2). Dentro del desarrollo embrionario del páncreas las primeras células endocrinas que aparecen son las expresoras de insulina ( $\beta$ ), seguidas de las expresoras de glucagón ( $\alpha$ ) y somatostatina ( $\delta$ ) y por último las PP (Pan y Brissova, 2014). En mamíferos las células  $\beta$  embrionarias de los islotes pancreáticos se consideran inmaduras, estas son altamente proliferativas y unipotentes con gránulos de insulina y un umbral de detección de glucosa muy bajo secretando insulina aún a bajos niveles de glucosa. Luego ocurre su maduración funcional después del nacimiento en donde adquieren el fenotipo maduro por el que dejan de ser altamente proliferativas y liberan insulina en respuesta a los niveles de glucosa correctos gracias al umbral de detección más alto (Liu y Hebrok, 2017; Salinno y cols., 2019).

##### Ciclo circadiano - Nutrición/Ayuno

El reloj circadiano es conocido como un temporizador interno de 24 horas (J. S. Takahashi, 2017). Este fue descrito a inicios del siglo XVIII a partir de que la planta de Mimosa siguiera teniendo ciclos de activación y descanso cada veinticuatro horas aún dentro de una caja oscura. Y tiempo después, mediante la evaluación genética en moscas de la fruta, se encontró que el reloj circadiano está codificado por activadores y represores transcripcionales que forman parte de un ciclo de retroalimentación de transcripción-traducción autorregulada (Bass y Takahashi, 2010). En mamíferos, el mecanismo molecular del ciclo de retroalimentación transcripcional autorregulada incluye genes centrales que codifican activadores (CLOCK y BMAL1) y represores (PER y CRY) (J. S. Takahashi, 2017). El reloj circadiano interno se sincroniza con los ritmos diurnos a través de señales (zeitgebers) como la luz y alimentación, para la utilización, movilización y eliminación de nutrientes durante horas del día en que se encuentran disponibles (Panda, 2016). Además de estas funciones metabólicas, también se ha determinado que, durante la maduración de los islotes pancreáticos, se encuentran involucrados varios genes relacionados al ciclo circadiano a través de una constante dinámica epigenética (Alvarez-Dominguez y cols., 2020; Rakshit y cols., 2018). Se ha encontrado que una de las principales diferencias entre las condiciones fisiológicas en las que se encuentran los islotes neonatales y los islotes maduros es la alimentación ya que dentro del vientre materno, se recibe una alimentación constante alta en aminoácidos, mientras que después del nacimiento empieza la interacción y equilibrio de la “alimentación/ayuno” además de un aumento en la ingesta de carbohidratos (Katsumoto y Grapin-Botton, 2020). Es por esto que se plantea que este cambio nutricional provoca la maduración funcional en las células  $\beta$  (Helman y cols., 2020).

Figura 2: Estructura del páncreas, distribución, nombre y función de las células que conforman los Islotes de Langerhans.



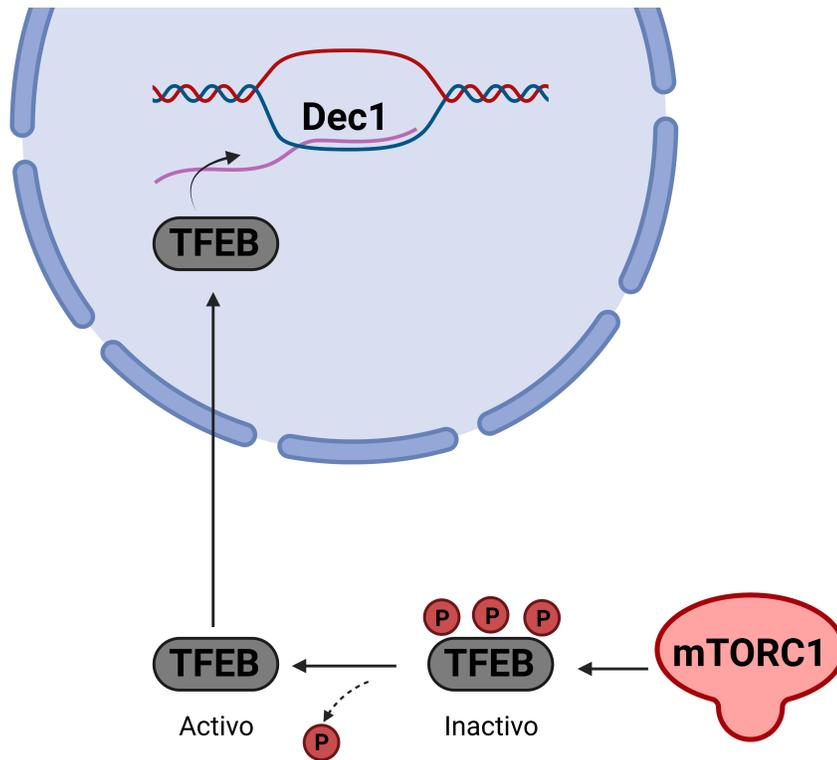
Elaborado en BioRender.com.

### Factores moleculares involucrados en la maduración de islotes (mTORC1, TFEB y DEC1)

El mTORC1 es un regulador clave para la biosíntesis celular. Este puede actuar como un sensor nutricional al detectar el estado metabólico celular y controlar el cambio entre anabolismo y catabolismo (Saxton y Sabatini, 2017). Se cree que esta capacidad de detección de mTORC1 contribuye a la maduración de los islotes pancreáticos, al funcionar como sensor nutricional durante el cambio de alimentación constante a intermitente entre los neonatos y adultos (Helman y cols., 2020). El mTORC1 es una quinasa que pasa de estar activa a inactiva entre los estados metabólicos de alimentación y ayuno, respectivamente. Como se puede observar en la figura 3 al estar activa mantiene fosforilado al factor de transcripción EB (TFEB) que lo mantiene retenido en el citosol. Pero cuando esta pasa a estar inactiva en un estado nutricional de ayuno, desfosforila a TFEB, lo cual permite su translocación al núcleo (Ballabio y Bonifacino, 2020).

El TFEB es un factor de transcripción parte de la familia MiT/TFE que fomenta la expresión de genes para la biogénesis lisosomal y la autofagia. Cuando hay daño lisosomal, mTORC1 es inhibida causando la activación de TFEB lo cual induce la biogénesis y autofagia facilitando el reemplazo y reciclaje del lisosoma dañado (Saxton y Sabatini, 2017). Además, también regula otros procesos celulares importantes como la diferenciación de células madre, endocitosis y el ritmo circadiano. La translocación al núcleo de este factor de transcripción puede ser debido a diferentes estímulos ambientales como la inanición, estrés oxidativo o daño mitocondrial (Ballabio y Bonifacino, 2020; Pastore y cols., 2019).

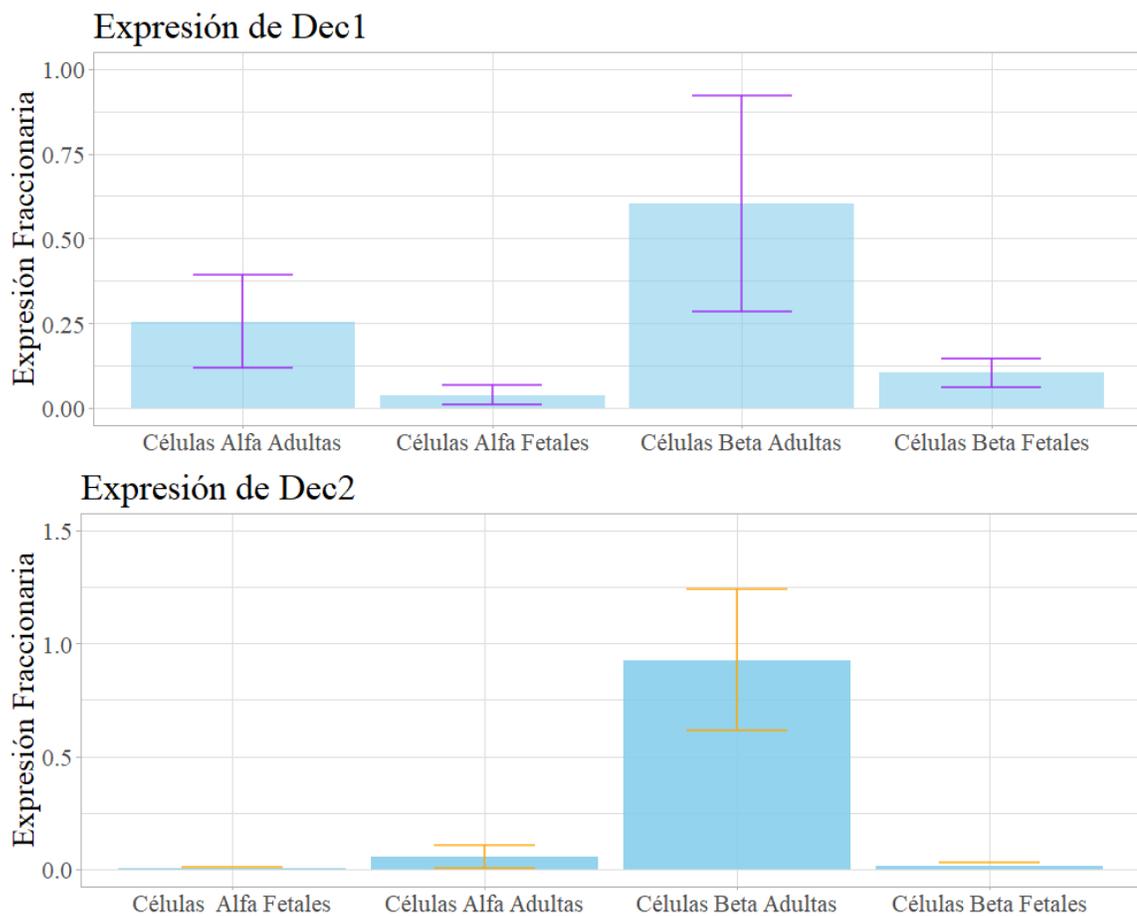
Figura 3: Interacción entre mTORC1 y TFEB.



La retención de TFEB en el citosol se debe a estar fosforilado por mTORC1 en su estado activo, mientras que al dejar de estarlo se permite su translocación al núcleo para la activación de Dec1. Elaborado en BioRender.com.

Los factores de transcripción Dec1/Sharp2/Bhlhe40 y Dec2/Sharp1/Bhlhe41 son moduladores del reloj circadiano mamífero, que interactúan con BMAL1 y compiten con CLOCK/BMAL1 al unirse a sus blancos, incluyendo sus propios promotores/potenciadores (Honma y cols., 2002; Kreslavsky y cols., 2017; Rossner y cols., 2008). Se ha demostrado que Dec1 y Dec2 son activados específicamente durante la maduración postnatal de las células  $\beta$  (Figura 4) (Alvarez-Dominguez y cols., 2020). Mientras que, la pérdida de Dec1 en células  $\beta$  resulta en ratones diabéticos debido a islotes fisiológicamente inmaduros. Estudios en células hepáticas también indican que la translocación de TFEB al núcleo puede activar a Dec1 (Pastore y cols., 2019). Y estudios preliminares indican que Dec1 se une a promotores/potenciadores de genes que codifican mediadores clave del aumento del umbral de glucosa para la secreción de insulina (Alvarez-Dominguez, Comunicación Personal).

Figura 4: Expresión de Dec1 y Dec2 en células Alfa ( $\alpha$ ) y Beta ( $\beta$ ) fetales y adultas.



Resultados de expresión de Dec1 y Dec2 obtenidos por medio de secuenciación de ARN (Alvarez-Dominguez, Comunicación Personal).

### 5.1. Hipótesis

En condiciones de ayuno, la actividad del complejo mTORC1 es suprimida, cambio que permite la translocación de TFEB al núcleo, donde promueve la expresión de Dec1 el cual a su vez se une a mediadores clave para la maduración de los islotes pancreáticos.

### 5.2. Diagrama

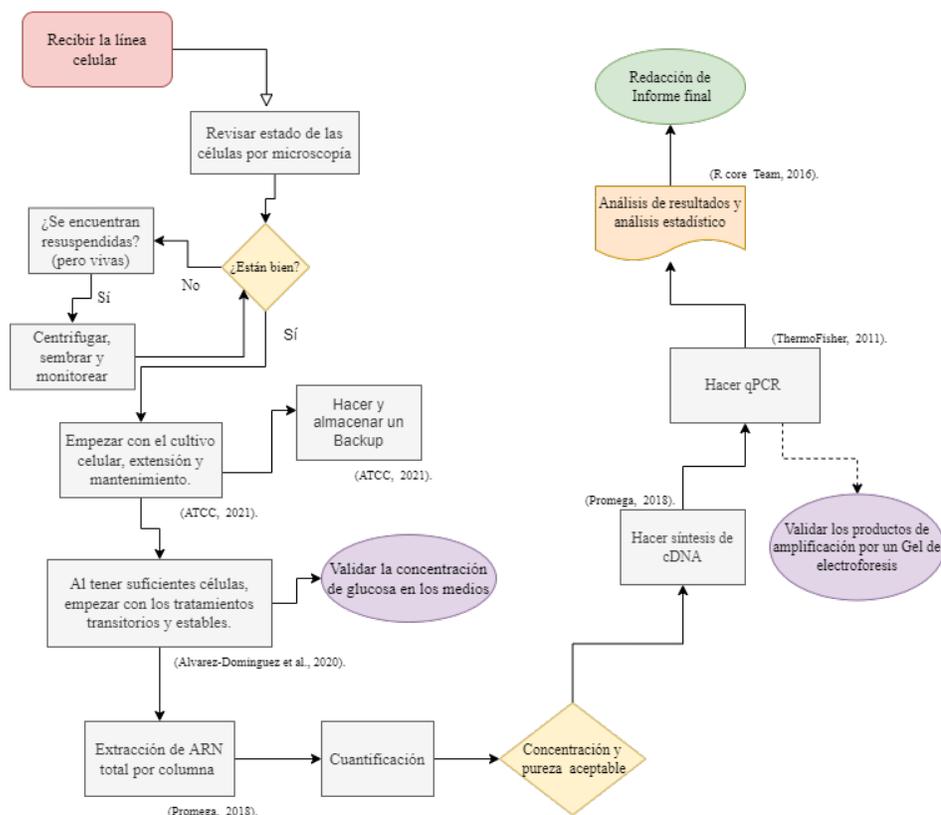
En el diagrama de la Figura 5 se ilustra la toma de decisiones que se siguió durante este estudio, desde la recepción de las células hasta el análisis de resultados.

### 5.3. Materiales y métodos

#### 5.3.1. Medidas de bioseguridad y mantenimiento de condiciones asépticas

La línea celular Beta-TC-6 (ATCC® CRL11506™) de *Mus musculus* que se utilizó posee un nivel de bioseguridad BSL-2, por lo que para el trabajo con ellas se aseguró el uso correcto y completo del equipo de protección personal (PPE): bata, guantes, cubre zapatos y mascarilla además de lavado de manos antes y después del trabajo en el laboratorio. Toda la manipulación y el manejo de las células se realizó dentro de una campana de flujo laminar la cual se esterilizó completamente con etanol al 70 % y luz UV por 15 minutos antes y después de uso. Todos los materiales y suministros que se utilizaron estaban completamente estériles, y antes de ser ingresados dentro de la campana se limpiaron con etanol al 70 %. Luego del trabajo y la esterilización del área los desechos se depositados en los contenedores BSL-2 correspondientes (ThermoFisherScientific, 2015; ATCC, 2021) .

Figura 5: Diagrama del flujo que se siguió durante el proceso de experimentación.



### 5.3.2. Mantenimiento de células

#### Medio de cultivo

Se trabajó con Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) Glucosa 25 mM (ATCC®) glucosa 5 mM (Corning®). Para la preparación del medio de cultivo completo se suplementaron ambos DMEM con FBS (Gibco®) a una concentración final de 15 % y con Pen-Strep a una concentración final de 1 % (Gibco®). Por ejemplo, en el caso del medio de glucosa 25 mM, para la preparación de 50 mL de medio de cultivo completo de mantenimiento se mezclaron 7.5 mL de FBS (Gibco®) y 0.5 mL de Pen-strep (Gibco®) con 42 mL de DMEM (ATCC®) el cual se almacenó a 4 °C.

#### Preparación de PBS 1X

Para preparar 1 L de PBS 1X se midieron 800 mL de agua UP (UltraPura) y en constante agitación se agregaron 8 g de Cloruro de Sodio (NaCl, EMSURE®), 0.2 g de Cloruro de potasio, (KCl, Sigma-Aldrich®), 1.44 g de Fosfato de sodio dibásico ( $Na_2HPO_4$ , Sigma-Aldrich®) y 0.245 g de Fosfato monopotásico ( $KH_2PO_4$ , EMSURE®), al terminar de disolver todo se midió el pH y verificó que se encontrara aproximadamente a 7.4, por último se aforó hasta completar los 1000 mL. Al recipiente se le colocó cinta testigo y se autoclaveó 20 minutos en la autoclave a 15 psi y 121 °C, luego se refrigeró hasta su uso (Bioquest, 2021a).

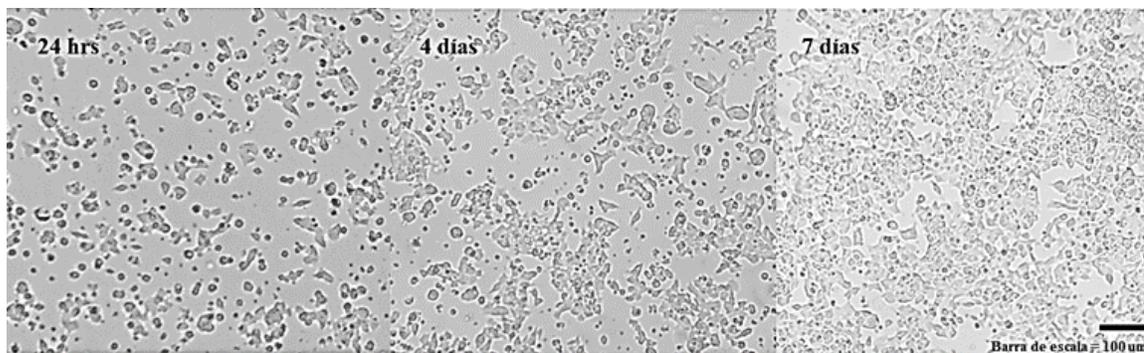
## Manejo

El mantenimiento y manejo de las células se realizó conforme al protocolo proporcionado por ATCC (2021). Las células fueron enviadas a temperatura ambiente por medio de FedEx. Se enviaron aproximadamente  $12.5 \times 10^6$  células en cada uno de los dos T-25 completamente lleno de medio de crecimiento completo de mantenimiento (DMEM, 25mM glucosa, ATCC®), 15 % FBS, Gibco®). Al momento de ser recibidas el contenedor se desinfectó con etanol al 70 % y se revisó macroscópica y microscópicamente en búsqueda de cualquier evidencia de contaminación evaluando cambios de pH, morfología sospechosa de las células o la presencia de bacterias u hongos. Después de confirmar que no había presencia de contaminación, se extrajo todo el medio de cada uno de los contenedores, se colocó en un tubo cónico de 50 mL y se centrifugó por 5 minutos a 300 xg. Luego se eliminó todo el medio de cultivo y se resuspendió el botón celular en 5 mL de medio de cultivo completo nuevo previamente atemperado, esta solución se colocó en T-25 y se incubaron en un incubador de cultivo de tejidos ( Thermo Scientific®, STERI-CYCLE i160) a 37 °C  $CO_2$  al 5 % hasta que estuvieron listas para su subcultivo cambiándoles medio cada 48 hrs.

## Examinación de las células

Se observó la morfología y viabilidad de las células todos los días de forma cuidadosa y aséptica. Para esto se evaluaron cambios en el color del medio: los cambios a morado o amarillo del rojo de fenol indican cambios inesperados del pH a causa de una posible contaminación o mal intercambio de gases respectivamente. También se evaluó la turbidez o la presencia de partículas o pequeñas colonias de hongos flotando en el medio. Con ayuda de un microscopio invertido (Motic®) con el objetivo 10x, se evaluó el medio en búsqueda de contaminación microbiana y la morfología de las células. La contaminación bacteriana se vería como pequeñas colonias (puntos) negros en los espacios entre las células, la hongos se observarían el micelio filamentosos. La morfología normal de las células se puede observar en la Figura 6, durante la mitosis las células pueden despegarse de la superficie, sin embargo, estas muestran una morfología redonda y refractil a comparación de las células muertas que se verían más oscuras y pequeñas (ATCC, 2021).

Figura 6: Beta-TC-6 ATCC® CRL11506™ de *Mus musculus*.



Se pueden observar las células a confluencia de 24 hrs, 4 y 7 días vistas en microscopio invertido en objetivo 10x ampliadas a 40x.

## Digestión con Tripsina-EDTA

Al momento de estar a un 80-90 % de confluencia y sin evidencia de contaminación se contaron las células, se hicieron los subcultivos, todo dentro de una campana de flujo laminar en condiciones asépticas. Todos los subcultivos o viales de respaldo se identificaron con la fecha, el número de pasaje y el número de células trasvasadas para su documentación. Para esto se realizó antes una digestión

con Tripsina-EDTA para asegurar el desprendimiento de las células de la superficie del contenedor ya que estas son células adherentes.

Para esto se atemperó la solución de Tripsina-EDTA (0.25 % p/v y 0.53 mM, respectivamente, Sigma-Aldrich®) y el medio de crecimiento completo a 37 °C previo a empezar la digestión. Se descartó el medio en el que las células se encontraban y se lavó cuidadosamente la superficie del contenedor con 5 mL de PBS 1x libre de magnesio y calcio, luego de retirar el PBS se agregaron 0.5 mL de la solución de Tripsina-EDTA y se dejó reposar en un incubador de cultivo de tejidos a 37 °C  $CO_2$  al 5% por 3.5 minutos, al momento de que las células se empezaron a separar, se dieron golpecitos el fondo de la placa para fomentar la separación de todas estas. Inmediatamente después de los 3.5 minutos se inactivó la Tripsina al agregar 6 ml del medio de crecimiento completo, seguido de la homogenización y resuspensión de las células gentilmente por pipeteo. Para eliminar la solución de Tripsina-EDTA se trasvasó a un tubo de centrifugación toda la solución y se centrifugó por 5 minutos a 200 x g para luego descartar el sobrenadante sin perturbar el botón celular y resuspender las células en 5 mL de medio fresco a 37 °C (ATCC, 2014).

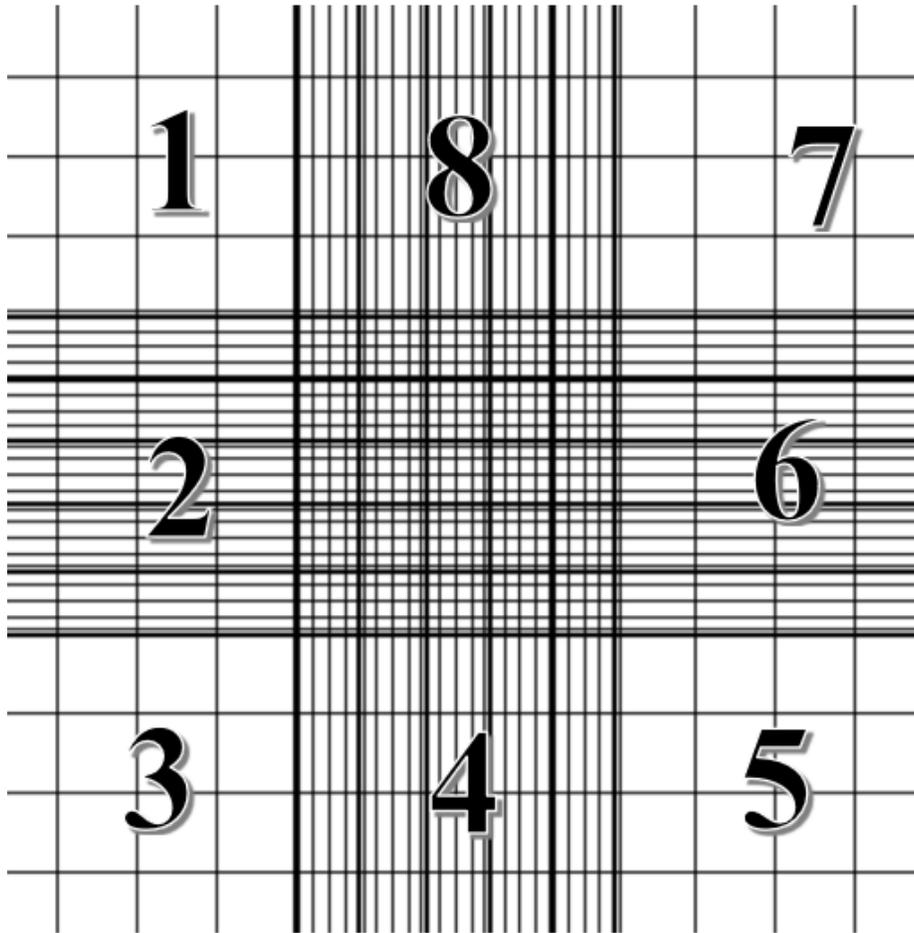
### Conteo

Para el conteo se utilizó una cámara de Neubauer o hemocitómetro. Este se limpió y secó junto con el cubreobjetos utilizando alcohol al 70 %, luego se colocó el cubreobjetos sobre la placa para formar el sistema de conteo. En un tubo de 1.5 mL se transfirieron 10 ul de la solución de células formada luego de la digestión con tripsina, después se prosiguió a la inactivación de esta agregando medio nuevo y la homogenización de las células para asegurar un conteo correcto. Se realizó una dilución 1:5 agregando 40 ul de azul de triptano a este tubo y mezclando cuidadosamente con la pipeta. Luego se transfirieron 10 ul de esta dilución a la placa utilizando una micropipeta colocando la punta de esta en uno de los lados del cuadro visible de la placa intentando dejar pasar el líquido en el espacio entre la placa y cubre objetos. Se colocó la cámara en el microscopio de contraste de fases y se observaron las células con el objetivo de 10x. Las células dentro de los cuadrantes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 de la Figura 7 se contaron y se determinó el promedio de células por cuadrante, el porcentaje de células viables (Ecuación 1) y la concentración de células por mililitro (Ecuación 2). Todo esto se realizó en duplicado asegurando contar al menos 250 células para tener una cantidad de células suficientes para modelar a la población completa (Strober, 2015).

### Subcultivo

Al terminar con el conteo de células se realizaron las alícuotas necesarias con el fin de sembrar aproximadamente  $0.2 \times 10^6$  de células por  $cm^2$  de superficie a utilizar, por ejemplo, si se utilizó un T-25 se sembraron 5M de células en total. Si del conteo se definió que habían  $10 \times 10^6$  de células en total, se dividió la solución en 2 alícuotas para ser sembradas en 2 T-25. Dentro del flujo de trabajo (Figura 8) se puede observar que se trabajó cada semana con dos contenedores T-25 (Corning®), uno para realizar criopreservación por cada pasaje y el otro para el mantenimiento de la línea durante los pasajes; estos se incubaron a 37 °C en incubadora de tejidos con  $CO_2$  al 5%. El contenido del segundo frasco se dividió en aproximadamente 10 pozos ( $1 \times 10^6$  células/pozo =  $0.4 \times 10^6$  células/cm<sup>2</sup>) de las placas de 24 pozos (COSTAR®) para iniciar con los distintos tratamientos después de que estas se hayan adherido correctamente a la placa luego de 24 hrs. Lo que quedó de este segundo contenedor se criopreservó en alícuotas de 1 mL a una concentración de  $5 \times 10^6$  células/ml (Poitout y cols., 1995; ATCC, 2021).

Figura 7: Cámara de Neubauer o Hemocitómetro.



Donde 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 son los cuadrantes utilizados para el conteo de las células.

**Ecuación 1:** Porcentaje de células viables.

$$\% \text{ células viables} = \frac{Clulasviables}{Clulasviables+Clulasnoviables} * 100$$

**Ecuación 2:** Concentración de células (células/mL)

$$[ ] \text{ células/mL} = \text{Promedio de células} * \text{Factor de dilución} * 10^4$$

(Strober, 2015)

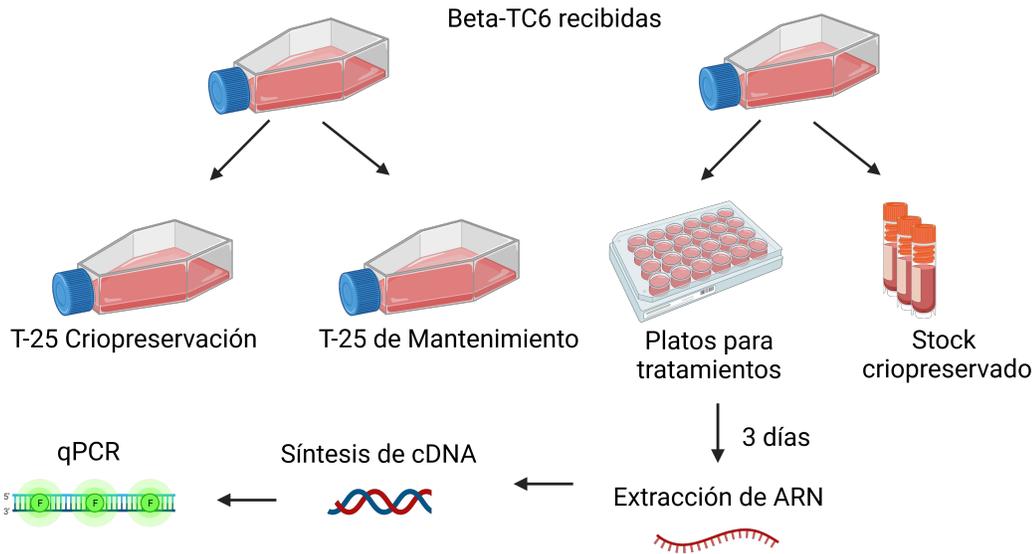
## Almacenamiento

### *Criopreservación*

Se preparó y rotuló con nombre, número de pasaje y cantidad de células un tubo de criopreservación por cada  $5 \times 10^6$  células a preservar. Del Flask de criopreservación (Figura 8) luego de pasar por el proceso de digestión con tripsina, la inactivación de la Tripsina y conteo. Al botón celular formado luego de ser centrifugada la solución de células y eliminado el medio en el que se encontraban se le agregó suficiente medio de cultivo completo con 5% (v/v) de DMSO al botón celular para tener  $5 \times 10^6$  Células por mililitro. Por ejemplo: Si se tenían  $10 \times 10^6$  células se homogenizarán en 2 mL de

medio completo de criopreservación. Esta solución muy bien homogenizada se dividió en alícuotas de 1 mL y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 24 horas, luego se pasaron a un tanque de nitrógeno líquido para su almacenamiento (ThermoFisherScientific, 2015).

Figura 8: Flujo de trabajo para el pasaje y división de las células al momento de su llegada.



Elaborado en BioRender.com.

### *Descongelamiento*

De ser necesario el uso de alguno de los respaldos almacenados se tomó uno de los viales y se descongeló en un baño de agua a  $37^{\circ}\text{C}$  por aproximadamente 1-2 minutos. Luego se esterilizó el vial con alcohol al 70% y se siguió con toda su manipulación en condiciones asépticas dentro de la campana de flujo laminar previamente esterilizada. Se transfirió gota a gota 1 mL de medio de cultivo completo al criotubo, luego se trasvasó gota a gota el contenido de este tubo a un tubo de 15 mL con 9 mL de medio de cultivo completo para luego centrifugarlo por 5 minutos a 200 xg. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular con 5 mL de medio de cultivo completo mediante un pipeteo gentil, luego se trasvasó a un T-25 previamente identificado con la fecha, el número de pasaje y el número de células trasvasadas, luego se colocó en un incubador de cultivo de tejidos a  $37^{\circ}\text{C}$  y 5%  $\text{CO}_2$  y se le cambió medio cada 48 hrs (ThermoFisherScientific, 2015).

### 5.3.3. Tratamiento estable y transitorio

#### Medios

##### *Preparación de medios para tratamiento*

Para los tratamientos se utilizó medio completo glucosa 5 mM (DMEM 5mM, 15% FBS y 1%

Pen-strep). Este se suplementó con glucosa para llegar a concentraciones de 8 mM y 20 mM (Medio completo para tratamientos estables y transitorios de 20 y 8mM respectivamente), para esto se preparó un Stock de 1 M de glucosa a partir de 1.8 gramos de glucosa (Sigma-Aldrich®) y 10 mL de agua UP, esta solución se filtró por un filtro de 0.2 um para su purificación. Luego, dentro de la campana estéril se tomó 0.24 mL y 1.2 mL del Stock y se colocó en 79.76 mL y 78.8 mL del medio de cultivo bajo en glucosa para llegar a las concentraciones de 8 mM y 20 mM respectivamente.

#### *Validación de la concentración de glucosa en los medios*

Para validar que los medios tuvieran la concentración esperada, se midió su concentración mediante un glucómetro (Accu-Chek®). Para esto se tomaron 500 uL de cada medio en tubos de 1.5 ml y se sumergió la tira del glucómetro en cada uno luego de ser homogenizado. Esto se realizó en duplicados y se anotó el resultado en mg/dc, esto se pasó a mM por medio de la Ecuación 3.

**Ecuación 3:** conversión de mg/dL a mM

$$[ ] \text{ Glu mM} = \frac{\text{concentracin del glucmetro(mg/dL)} * 10}{180\text{g/mol}}$$

### **Establecimiento de los tratamientos**

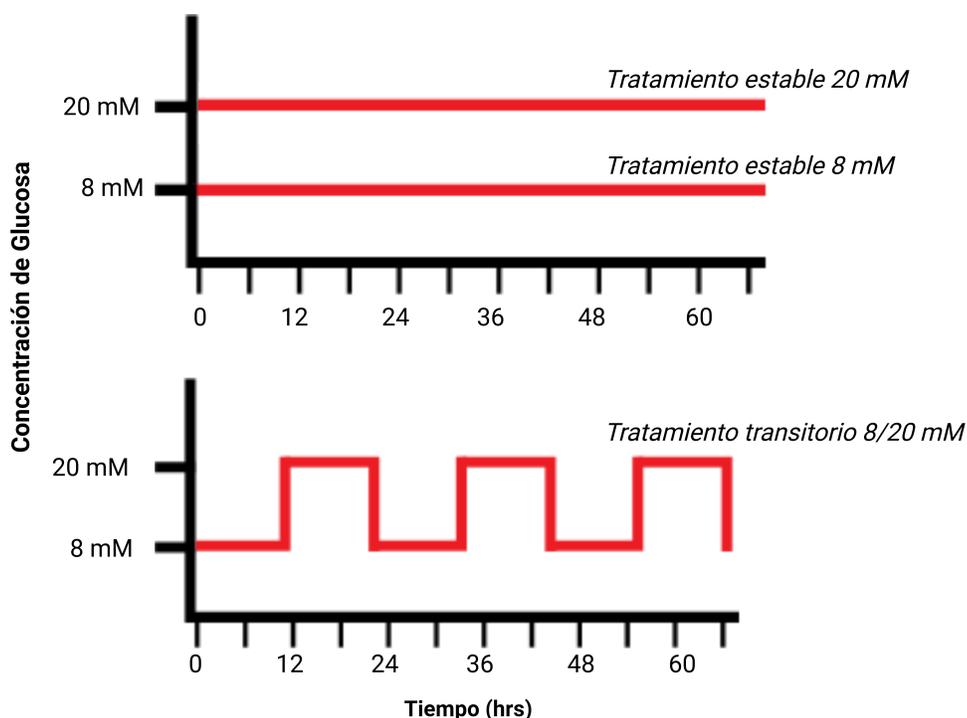
En 10 pozos de una placa de cultivo de tejidos de 24 pozos (COSTAR®), se sembraron aproximadamente  $1 \times 10^6$  células por pozo suspendidas en 0.5 mL de medio completo para dar inicio a los tratamientos los cuales se realizarán según (Alvarez-Dominguez y cols., 2020). Se esperaron 24 horas para la adhesión de las células a la superficie de los pozos, luego se inició con el cambio de medio para los tratamientos. Por 3 días se estuvo trabajando los distintos tratamientos como se muestra en la Figura 9 y 10. Tratamiento con glucosa 8 mM estable (2 de los pozos con cambio de medio cada 48 horas), Tratamiento con glucosa 20 mM estable (2 de los pozos con cambio de medio cada 48 horas), Control estable 5 mM (2 de los pozos con cambio de medio cada 48 horas). Tratamiento con glucosa 8 mM /20 mM transitorio (2 de los pozos intercalando los medios de glucosa 8 mM y 20 mM cada 12 horas) y el Control glucosa 5 mM /5 mM Transitorio (2 de los pozos con con cambio de medio de 5 mM de glucosa cada 12 horas). Inmediatamente después de estos 3 días se procedió a hacer la extracción de ARN.

#### **5.3.4. Extracción de ARN**

Se utilizó el Kit de extracción de ARN *Total SV Total RNA Isolation System* de Promega (Promega, 2018b). Antes de comenzar con la extracción de ARN se creó un ambiente libre de ribonucleasas, utilizando RNaseZap para limpiar todas las superficies luego de haber utilizado etanol al 70%. Todos los demás suplementos y materiales que se utilizaron cumplieron con el certificado de material libre de nucleasas y sus recipientes se limpiaron con un paño húmedo con RNaseZap.

En la campana de flujo laminar previamente esterilizada como se mencionó anteriormente se les retiró y desechó el medio de cultivo completo a las células dentro de los pozos, la capa adherida a la superficie se lavó con PBS 1X sin calcio ni magnesio frío y estéril, al remover esta solución, se agregaron aproximadamente 100 uL de solución de Tripsina-EDTA previamente atemperada para cubrir la capa de células en la placa. Se mezcló la placa de cultivo con movimientos suaves y se incubó aproximadamente 3.5 minutos a 37 °C en incubadora de cultivo de tejidos con  $CO_2$  al 5%. Luego de este tiempo, se dieron golpecitos el fondo de la placa para fomentar la separación de todas las células, luego se agregó 1 mL de medio de cultivo completo atemperado y se mezclará por pipeteo gentil para terminar de separar las células y homogenizarlas. Por último, para eliminar la solución de Tripsina-EDTA se trasvasó a un tubo de centrifugación de 2 mL y se centrifugaron por 5 minutos a 200 xg para descartar el sobrenadante, el botón celular se lavó con 1 mL de PBS 1X sin calcio ni magnesio.

Figura 9: Diagrama de concentración de glucosa de los distintos tratamientos.



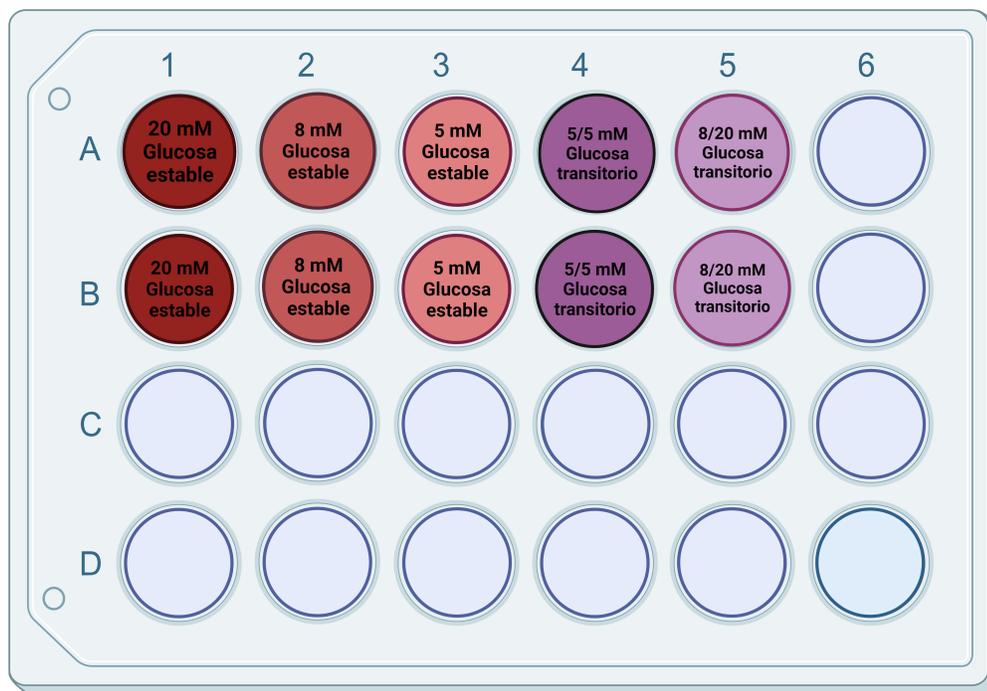
Mostrando en el eje x la concentración de glucosa y en el eje y las horas. Para los tratamientos de glucosa estable 20 mM, glucosa estable 8 mM y glucosa transitorio 8 mM /20 mM. Elaborado en BioRender.com.

Todas estas células colectadas (alrededor de  $5 \times 10^6$ ) se volvieron a centrifugar a 300 xg por 5 minutos, luego se descartó el sobrenadante y se realizó un lavado con 1 ml de PBS libre de calcio y magnesio estéril y frío centrifugandolas de nuevo a 300 x g por 3 minutos para colectar las células y descartar el sobrenadante. Se agregaron 175  $\mu$ l de RNA Lysis buffer a las células ya lavadas y sin PBS, homogenizando el botón celular con vortex vigoroso. A esta solución se le agregaron 350  $\mu$ l de buffer de dilución de ARN y se mezcló por inversión de 3-4 veces, luego se colocó en un bloque térmico a 70°C por 3 minutos, para pasar a su centrifugación 10 minutos a 14,000 x g. Luego de la centrifugación si se observaba un botón celular viscoso se descartaba con ayuda de una micropipeta.

Después se le agregaron 200  $\mu$ l de etanol 95 %, se mezcló por pipeteo 3 a 4 veces y se preparó el sistema tubo-columna. El lisado con etanol se transfirió al sistema tubo-columna y se centrifugó 1 minuto a 14,000 x g, luego se descartó el líquido del tubo de recolección y se colocó de nuevo con la columna. A esta columna se le agregaron 600  $\mu$ l de RNA Wash solution diluida en etanol y se centrifugó un minuto a 14,000 x g. Al momento de vaciar el tubo de recolección, se procedió a preparar la mezcla de incubación de ADNasa (40 $\mu$ l de yellow core buffer con 5  $\mu$ l de 0.09 M *MnCl*<sub>2</sub> y 5  $\mu$ l de ADNasa I por reacción).

Después se agregaron 50  $\mu$ l de la mezcla de incubación a la columna, y se incubó por 15 minutos a 20-25°C. Luego de este tiempo se agregaron 200  $\mu$ l de DNase stop solution y se centrifugó por 1 minuto a 14,000 x g. El tubo de recolección se vació y se agregaron 600  $\mu$ l de RNA Wash Solution, seguido por una centrifugación 1 minuto a 14,000 x g. El tubo de recolección se vació nuevamente y se agregaron 250 $\mu$ l de RNA Wash solution, para centrifugar por 2 minutos a máxima velocidad. Por último, se transfirió la columna al tubo de elución y se agregaron 25  $\mu$ l de agua libre de nucleasas, para centrifugar por 1 minuto a 14,000 x g. Esta solución ya contenía el ARN deseado, el cual se

Figura 10: Diagrama de distribución de los pozos y los tratamientos a los que serán sometidas las células por 3 días.



Luego de los 3 días se procederá a la extracción de ARN, síntesis de ADNc, PCR tiempo real de retrotranscripción y análisis de resultados. Elaborado en BioRender.com.

cuantificó y almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso para la síntesis de ADNc.

Para la segunda y tercera extracción de ARN se normalizó la cantidad de ARN a utilizar dentro de la síntesis de ADNc llevando todas las extracciones a 50 ng/mL. Por ejemplo si en una de las muestras el nanodrop dio una concentración de 100 ng/mL a esta se le agregaron 25 uL de agua libre de nucleasas para llegar a una concentración de 50ng/uL (Ecuación 4).

**Ecuación 4:** Cantidad de agua a agregar para la normalización de la extracción de ARN.

$$\text{uL a agregar} = \frac{25(x)}{50-x}$$

**Donde:**

x = concentración en ng/uL obtenida del nanodrop

### 5.3.5. Síntesis de ADNc

Para la síntesis de ADN complementario, se utilizó el Kit *GoScript Reverse Transcription System* de Promega (Promega, 2018a). Después de haber evaluado la concentración de ARN extraída de cada una de las muestras en el paso anterior se procedió a limpiar la campana blanca con Etanol al 70 % y se dejó actuar la UV por 15 minutos mientras que en la campana de trabajo de ARN se realizaron las soluciones de 5 uL del ARN y los Oligos como lo muestra el Cuadro 1 para cada uno de las

muestras de ARN extraídas en tubos de 0.2 mL.

Cuadro 1: Mezcla de ARN y oligos para una reacción de síntesis de ADNc.

Componente	Cantidad final
Oligo dT <i>primers</i> (0.5 ug por reacción)	1 ul
Random <i>primers</i> (0.5 ug por reacción)	1 ul
ARN extraído (0.15 ug por reacción)	3 ul
<b>Volumen final</b>	<b>5 ul</b>

Este volumen final se incubó por 3 min a 70 °C, luego de esta incubación se colocó inmediatamente en un baño de hielo por 5 minutos. A estos se les dio un spin por 10s en la centrifugadora y se mantuvieron en baño de hielo hasta ser agregados a la mezcla de transcripción reversa o Master Mix (MM). Esta mezcla se preparó en la campana blanca combinando los reactivos enlistados en el Cuadro 2 en el orden descrito.

Cuadro 2: Componentes del Master Mix para la síntesis del ADNc.

Componente	1X	10X
Agua libre de nucleasas	Hasta 15 ul	Hasta 150 ul
GoScript 5X Reaction Buffer	4 ul	40 ul
MgCl <sub>2</sub> (1.5-5 mM concentración final)	2 ul	20 ul
dNTPs (concentración final 0.5 cada uno)	1 ul	10 ul
Inhibidor de Ribonucleasa	0.5 ul	50 ul
GoScript Reverse Transcriptase	1 ul	10 ul
<b>Volumen final</b>	<b>15 ul</b>	<b>150 ul</b>

Luego de tener la solución del Master Mix, se homogenizó por pipeteo y se dividió en alícuotas de 15uL en los tubos de 0.2 mL colocados en hielo en el paso anterior con los 5 ul de la mezcla de ARN y oligos, a los cuales se les dió un mini spin para recuperar todo el volumen en el fondo del tubo y por último se colocaron dentro del termociclador con el programa de síntesis de la primera hebra (Cuadro 3). Este ADNc se almacenó a -20 °C hasta su uso en el PCR tiempo real.

Cuadro 3: Programa de termociclador para la síntesis de la primera hebra.

Paso	Temperatura	Tiempo
Activación de la polimerasa	25 °C	5 minutos
Desnaturalización	42 °C	60 minutos
Alineación y extensión	15 °C	15 minuto

### 5.3.6. Preparación de *primers*

#### Preparación de buffer TE

El buffer TE se preparó a partir de EDTA 0.5 M (Invitrogen®) y Tris-HCl 1 M (Ultrapure®). Se tomaron 100 uL de la solución de EDTA 0.5 M y se mezclaron en 900 uL de agua DEPC (Invitrogen®), de esta solución de 0.05 M se tomaron 300 uL y se mezclaron en 10 mL de agua DEPC. Luego se procedió a agregar 150 uL de la solución de Tris-HCl 1 M, esto se mezcló y se confirmó que la solución estuviera a pH 8. Por último, se aforó a 15 mL agregando los 4.55 mL restantes de agua, se mezcló muy bien y se filtró por un filtro 0.2 um (Bioquest, 2021b).

## Resuspensión

La secuencia de los *primers* a utilizar se obtuvo de Origene (<https://www.origene.com/products/gene-expression/qpcr/primer-pairs>) estos se ordenaron en IDT y se resuspendieron en buffer TE (10 mM Tris-HCl y 0.1 mM EDTA pH 8). El Stock principal se encontraba a 100 uM, al agregar a cada primer liofilizado la cantidad de buffer TE indicado utilizando la Ecuación 5. Por ejemplo, si el rendimiento del oligo es 25 nmoles se resuspendió en 250 uL de buffer TE. Luego se realizaron las alícuotas a 20nM para su uso en el PCR tiempo real tomando 20 uL de la solución Stock y agregándole 80 uL de buffer TE. Los *primers* se almacenaron en un refrigerador a -20 hasta su uso (IDT, 2017).

**Ecuación 5:** Volumen de buffer TE para la resuspensión de los *primers* para generar la solución Stock de 100 uM.

$$\text{uL de TE} = \text{Rendimiento del oligo (nmol)} * 10$$

(IDT, 2017)

Cuadro 4: Lista y descripción de *primers* a utilizar dentro del PCR tiempo real de retrotranscripción.

Clave	Nombre	Secuencia	Descripción
G1	mBhlhe40_F mBhlhe40_R	CGGATTAACGAGTGCATTGCC GCTTCAACGTAAGCTCCAGAACC	Gen de interés Dec1
G2	mNr1d1_F mNr1d1_R	CAGGCTTCCGTGACCTTTCTCA TAGGTTGTGCGGCTCAGGAACA	Modulador periférico del reloj circadiano: Nr1d1
G3	mArntl_F mArntl_R	ACCTCGCAGAATGTCACAGGCA CTGAACCATCGACTTCGTAGCG	Componentes centrales del reloj
G4	mPer1_F mPer1_R	GAAACCTCTGGCTGTTCTACC AGGCTGAAGAGGCAGTGTAGGA	circadiano: Arntl y Per1
G5	mMyc_F mMyc_R	TCGCTGCTGTCCTCCGAGTCC GGTTTGCCTCTTCTCCACAGAC	Modulador periférico del reloj circadiano: Myc
18S	m18S_rRNA_F m18S_rRNA_R	GTAACCCGTTGAACCCCAT CCATCCAATCGGTAGTAGCG	Gen de referencia: ARNr 18S

En donde R = Reverse y F = Forward.

### 5.3.7. PCR en tiempo real

Se utilizó el protocolo descrito en el Kit Power SYBR® green Master Mix (ThermoFisherScientific 2011). Para esto se atemperó el Power SYBR® green Master Mix y los *primers* a utilizar enlistados en el Cuadro 4, estos se mezclaron con vórtex y se les dió un spin para recuperar el volumen completo en el fondo del tubo.

Se realizó el Master Mix para el PCR tiempo real combinando los reactivos enlistados en el Cuadro

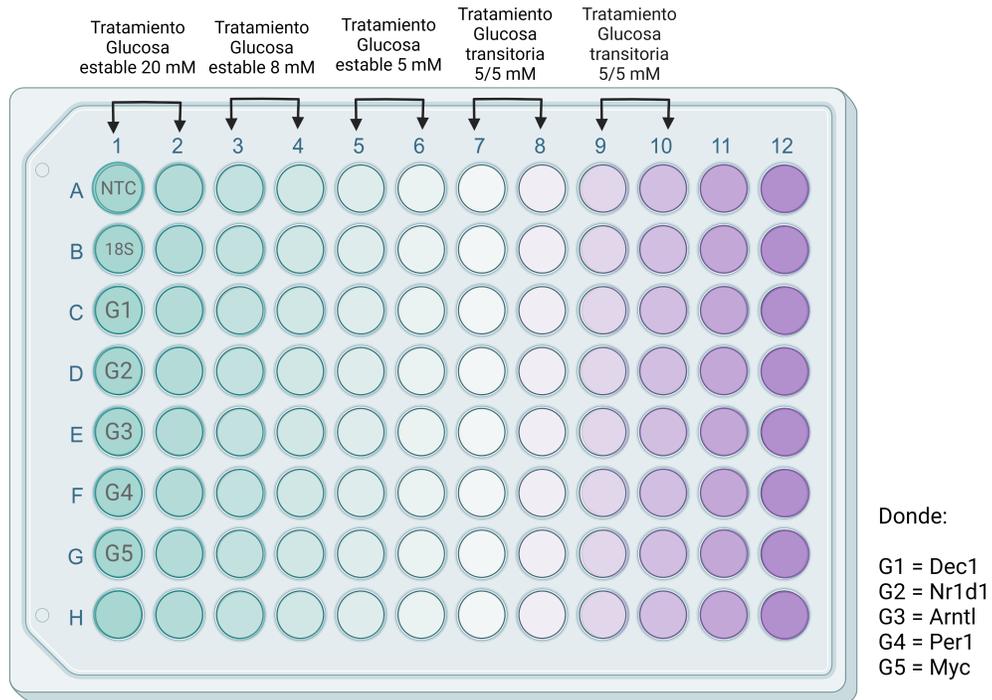
5 en el orden descrito tomando en cuenta que para cada uno de los genes se realizó un duplicados y que fueron 5 tratamientos por lo que para cada uno de los genes se preparó aproximadamente Master Mix para 20 reacciones.

Cuadro 5: Componentes del Master Mix para PCR tiempo real.

Componente	1X	20X
GoTaq qPCR Master Mix (2x)	10 uL	Hasta 200 ul
Forward <i>primer</i> (20x)	1 ul	20 ul
Reverse <i>primer</i> (20x)	1 ul	20 ul
Agua libre de nucleasas	8 ul	160 ul
Volumen final	20 ul	400 ul

Se realizó la amplificación por duplicados por lo que se utilizaron dos pozos por gen y control a evaluar. A cada pozo de la placa de 96 pozos se le agregarán 20 ul de Master mix, luego se agregaron 5 uL del ADNc sintetizado en el paso anterior tomando en cuenta el mapa de reacciones de la Figura 11, el control (NTC) llevaba toda la mezcla de reacción a excepción del ADNc sintetizado para cada tratamiento, en su lugar este llevó 5 ul de agua libre de nucleasas. Por último, se selló la placa y se colocó en el termociclador (ABI 7500®) utilizando el programa para la evaluación de expresión génica (Cuadro 6).

Figura 11: Mapa de la placa de 96 pozos para el PCR tiempo real para todos los tratamientos y genes.



Elaborado en BioRender.com.

Cuadro 6: Programa del termociclador tiempo real para evaluación de expresión génica por PCR tiempo real.

Paso	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Activación polimerasa	1	95 °C	2 minutos
Desnaturalización	40	95 °C	15 segundos
Alineación y extensión		60 °C	1 minuto
Curva de disociación	1	95 °C	15 segundos
		60 °C	1 minuto

### Validación de la amplificación de los productos de interés

Para la validación de la amplificación correcta de los productos deseados se realizó un gel de agarosa al 2% para el cual se disolvió la agarosa en buffer TBE 1x y se calentó por 2 minutos interrumpidos durante periodos cortos para su homogenización. Luego se dejó enfriar la solución por unos minutos y se le agregó GelRed®, luego se colocó en la cámara de polimerización (RunOne™) ya armada con el peine y se dejó polimerizar por 15 minutos. Por último, se cargaron las muestras de la primera amplificación de prueba de los genes de interés con 1 uL de 5x DNA gel loading buffer y se cargó la escalera Perfect DNA™ 50 bp Ladder (Novagen™). Este se corrió en el sistema de electroforesis (RunOne™) a 50 V por 1 hora y 30 minutos y se visualizó en un transiluminador (UV BioDoc-It® 220 Imaging System) (Boeuf y cols., 2005). Para comprobar el tamaño esperado de los amplicones se buscó en NCBI la secuencia de cada uno de los genes de interés utilizando como referencia los códigos más recientes incluidos dentro de la página de Origene, luego por medio de Primer3 y BLAST se alinearon los *primers* con el gen dando así el resultado la longitud esperada para cada fragmento a amplificar en pb.

### 5.3.8. Análisis de resultados

#### Análisis de expresión génica relativa

A partir de las corridas anteriores de PCR tiempo real de retrotranscripción se obtuvieron los Ct (ciclos necesarios para llegar al umbral) de cada uno de los genes analizados para los 5 tratamientos. Para su análisis se utilizó un análisis de expresión relativa por el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Rao, Huang, Zhou, y Lin, 2013) en la que se utilizó al gene m18S\_rRNA como nuestro *Housekeeping* debido a su poca variabilidad en el rango de expresión en una variedad de tejidos y condiciones (Van Acker y cols., 2019). Dentro del análisis se tomó la expresión de este como un 1 estableciendo un punto específico de comparación por lo que la expresión de los demás genes será relativa a la expresión de este.

Para realizar este método utilizaron las siguientes ecuaciones:

**Ecuación 6:** Determinación de la expresión relativa (Rao y cols., 2013).

Expresión relativa del gen X =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$

**Donde:**

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{muestra tratada}) - \Delta Ct(\text{muestra control})$$

**Donde:**

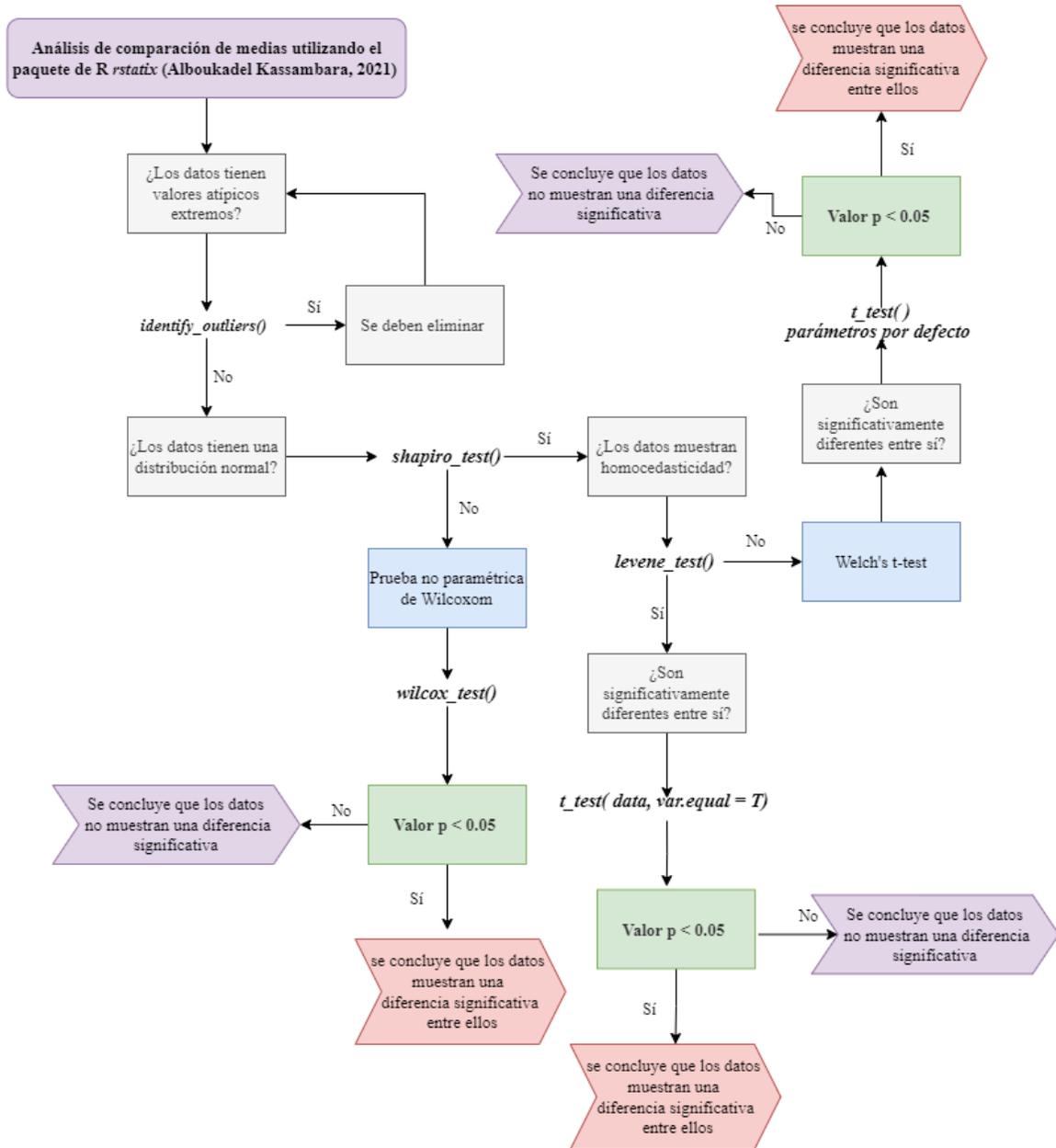
$$\Delta Ct = \Delta Ct(\text{gen de interés}) - \Delta Ct(\text{gen } Housekeeping)$$

## Análisis estadístico

El análisis estadístico y las gráficas fueron elaborados en R (Core Team y cols., 2016). El paquete que se utilizó fue rstatix (Kassambara, 2021) para las pruebas paramétricas y ggplot (Wickham, Chang, y Wickham, 2016) para la elaboración de las gráficas. Dentro del estudio se trabajó con los niveles: Glucosa 20 mM Estable, Glucosa 8 mM estable, glucosa 5 mM control estable, Glucosa 8 mM /20 mM transitorio y glucosa 5 mM /5 mM control transitorio. Los cuales se evaluaron por pares comparando el control glucosa 5 mM estable vs todos los demás tratamientos.

Al estar comparando por pares, se utilizó la prueba paramétrica T de Welch de comparación de medias utilizando el diagrama de decisiones ilustrado en la Figura 12. Por lo que primero se evaluó la existencia de datos extremos atípicos con la función `identify_outliers()`. Sí en caso se presentan este tipo de datos, estos se eliminan y se comprueba que ya no hayan con la misma función. Al no presentar este tipo de datos se evaluó la normalidad de los datos obtenidos con la prueba de Shapiro-Wilk con la función `shapiro_test()`. La hipótesis nula de la prueba de Shapiro-Wilk plantea que los datos evaluados tienen la misma distribución que una distribución normal. En el caso de mostrar normalidad ( $p > 0.05$ ) se evaluó la homocedasticidad de los datos utilizando la función `levene_test()`, La hipótesis nula de la prueba de Levene plantea que los datos evaluados tienen la misma varianza a lo largo de los distintos niveles. Por lo que con un valor p mayor al alfa (0.05) no se rechaza la hipótesis nula y se puede concluir que los grupos de datos poseen varianza constante. En el caso de que el valor p sea menor al alfa (0.05) se rechaza la hipótesis nula y se puede concluir que no todos los datos poseen una varianza constante por lo que se realizó la prueba T de Welch con la función `t_test()` utilizando los parámetros por defecto. Pero si estos muestran varianza constante se utiliza especificando este parámetro del modo: `t_test(datos, var.equal = T)`. La hipótesis nula de estas pruebas plantea que los promedios son iguales, la cual se debe rechazar en caso de que el valor  $p < 0.05$  (Kassambara, 2019). Por último, se utilizó un *software* en línea para la estimación del tamaño de muestra necesario para aumentar el poder estadístico en próximos estudios utilizando los datos obtenidos a partir de las pruebas y análisis anteriores (Soper, 2022).

Figura 12: Diagrama de decisiones para el análisis de comparación de promedios por medio de R, comparando 2 niveles



(Kassambara, 2021)

## 6.1. Establecimiento de la línea celular

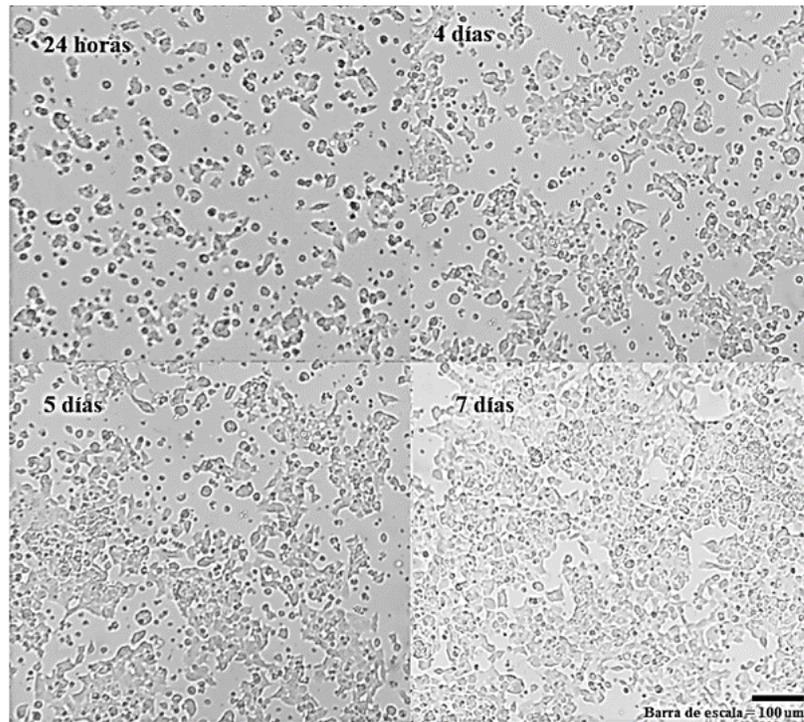
En este estudio se estableció la línea celular Beta-TC-6 (ATCC® CRL11506™) de *Mus musculus* dentro de la Universidad del Valle de Guatemala. 7 días después de la llegada de las células estas ya mostraban una confluencia suficiente para comenzar con los subcultivos correspondientes para su uso, mantenimiento y almacenamiento (Figura 13).

Los tratamientos se realizaron por 3 semanas, dentro de las cuales se evaluó el crecimiento de las células en los Flask T-25 de mantenimiento y de criopreservación mediante un conteo con hemocitómetro de cada cosecha, luego de su digestión con tripsina previo a su división (Figura 14). Además, se evaluó su viabilidad a través de tinción con azul de Tripano (Anexos, Cuadro 1). Dentro de la Figura 14 se puede observar que las células tuvieron un crecimiento bastante similar durante las tres semanas, creciendo en promedio  $19.7 \pm 2.5 \times 10^6$  células totales dentro de los Flask de 25 cm<sup>2</sup> luego de haberlas sembrado a una densidad de  $0.2 \times 10^6$  células/cm<sup>2</sup>.

## 6.2. Análisis de expresión génica

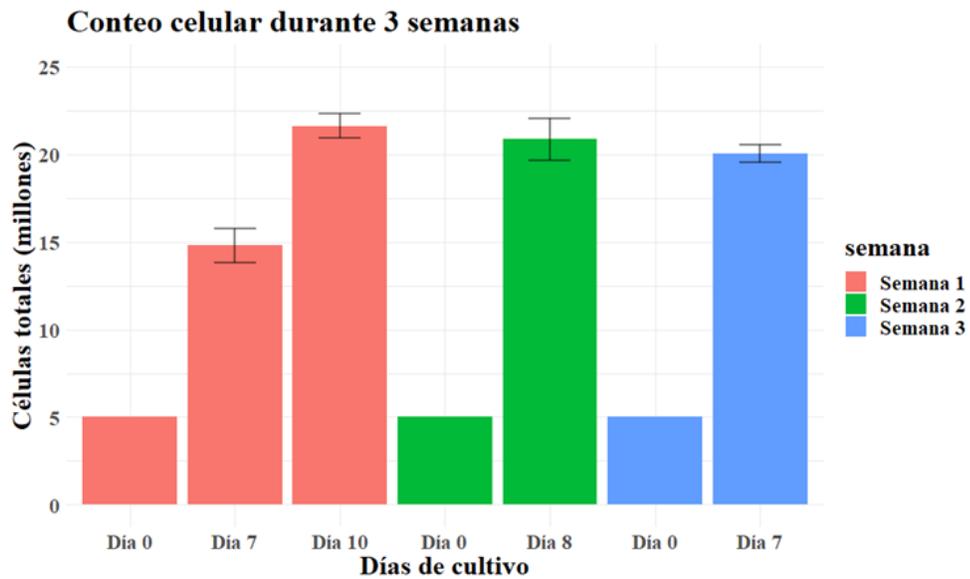
Para evaluar el papel que cumple la nutrición en la expresión de los genes de interés, en la línea celular previamente establecida, primero se validaron los *primers* de PCR a utilizar (listados en Métodos, Cuadro 4). Se analizó un Gel de Agarosa al 2% luego de la extracción de ARN, síntesis de ADNc, y PCR en tiempo Real, a partir de  $2.5 \times 10^6$  de células tomadas de la primera cosecha de uno de los T-25 recibidos. Como se muestra en la Figura 15, se observaron los amplicones de tamaños esperados, validando así los *primers*.

Figura 13: Crecimiento y visualización de las células en un microscopio invertido en objetivo 10x ampliadas a 40x.



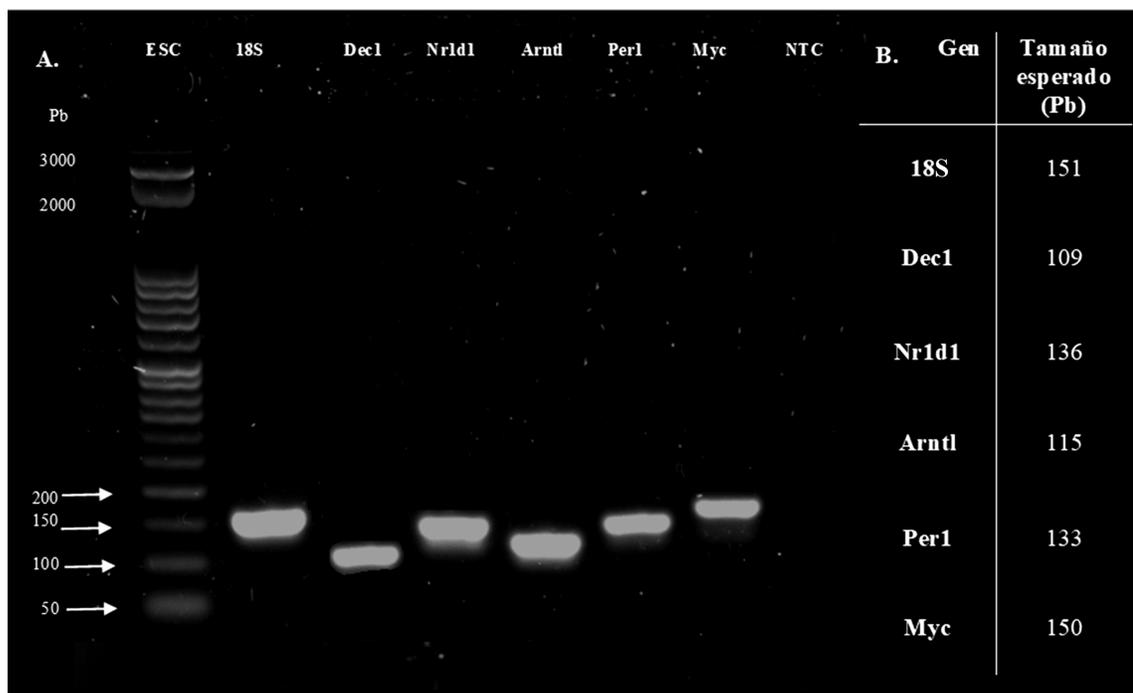
Visualización después de 24 hrs, 4 días, 5 días y 7 días luego de su llegada a la Universidad del Valle.

Figura 14: Tasa de crecimiento de las células Beta-TC-6 durante 3 semanas.



Número de células totales después de su digestión con tripsina, obtenido por medio de conteo manual en duplicado bajo microscopio, usando un hemocitómetro, a lo largo de tres semanas de tratamiento luego de 7, 8 y 10 días de haber sembrado 5 millones de células en un Flask de 25 cm<sup>2</sup>. Para datos y viabilidad ver Anexos, Cuadro 1.

Figura 15: Validación de productos del PCR en tiempo real de retrotranscripción.



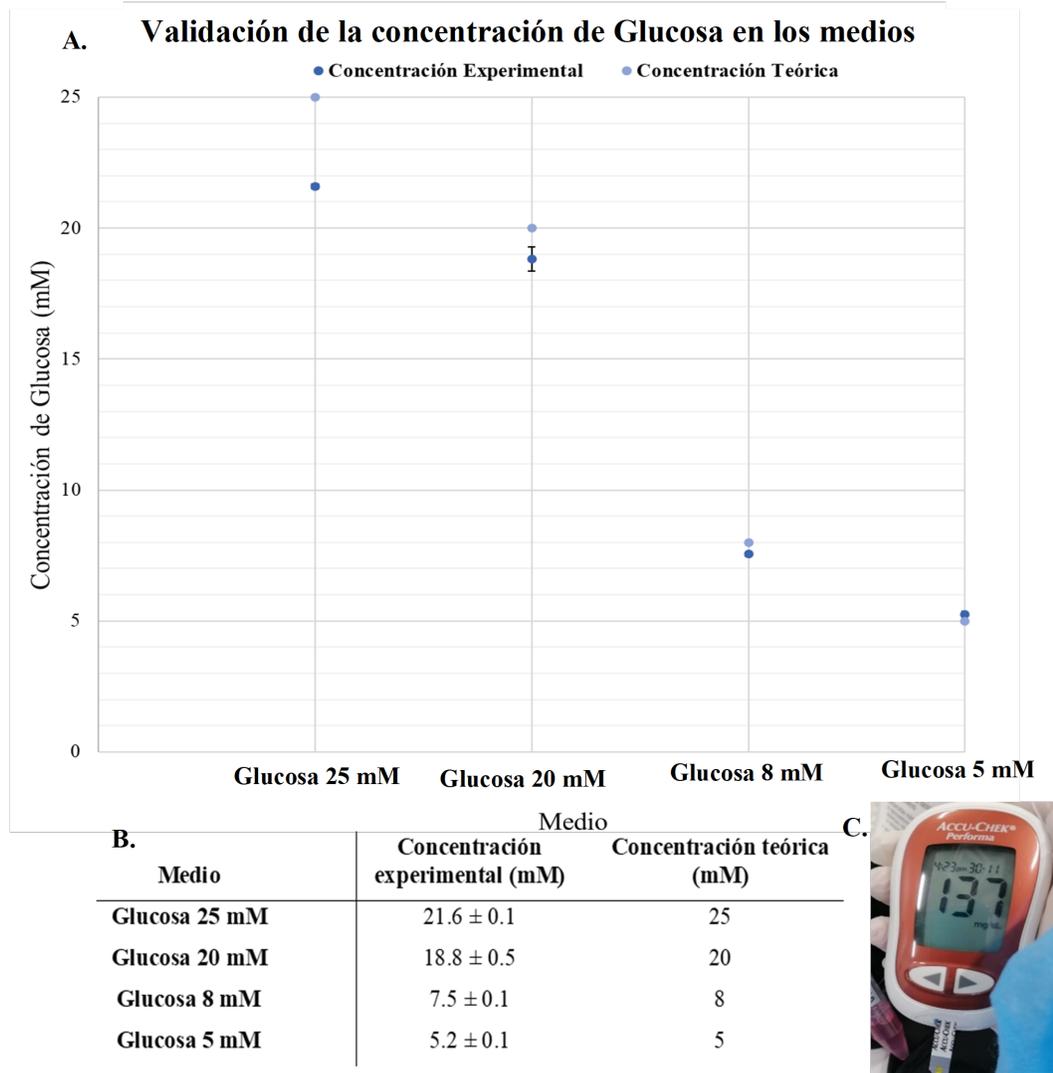
(A) amplificación observada para los productos en un gel de agarosa 2%, separados a 50 V durante 1 hora y 30 minutos y visualizados utilizando GelRed® y la escalera Perfect DNA™ 50 bp Ladder (Novagen™)

(B) Tamaño esperado en Pb para los amplicones, determinados según Primer3 y BLAST.

Luego de esto, se midió en duplicado la concentración de glucosa en los medios a utilizar, por medio de un glucómetro (Accu-Chek®), 10 mg/dL - 600 mg/dL), para validar las diferentes concentraciones de glucosa correspondientes a cada uno de los tratamientos: Glucosa 20 mM estable, Glucosa 25 mM estable, Glucosa 8 mM estable, Glucosa 5 mM estable, Glucosa 5 mM / 5 mM transitorio, Glucosa 8 mM / 20 mM transitorio (Figura 16).

Por último, luego de extraer el ARN de las células después de 3 días de estar sometidas a los diferentes tratamientos de cada semana (ver Anexos, Cuadro 2 para cuantificación y pureza), se realizó PCR tiempo real de retrotranscripción para medir, mediante los Ct obtenidos, la expresión relativa de cada gen de interés. La expresión relativa se obtuvo mediante la Ecuación 6 de Métodos, normalizando el Ct del gen de interés relativo al Ct de un gen *housekeeping* (que en este caso fue el ARNr 18S) como punto específico de comparación. Los valores resultantes fueron subsecuentemente comparados con el tratamiento control (glucosa 5 mM estable). Los resultados finales fueron graficados por medio de R en diagramas de caja y bigotes usando el paquete ggplot2 (Figuras 17 y 18).

Figura 16: Validación de la concentración de Glucosa en los medios para los distintos tratamientos.

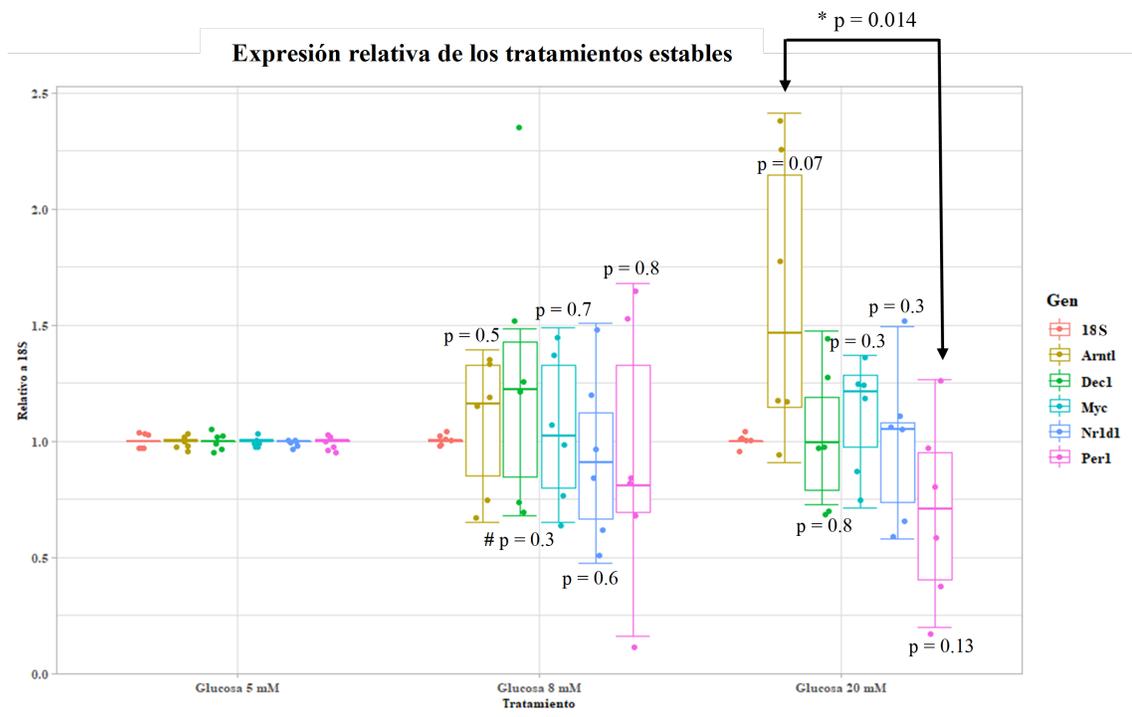


(A) Gráfica de puntos para la concentración experimental vs la esperada. (B) Cuadro de datos de la concentración experimental y esperada. (C) ejemplo de la medición de la concentración de glucosa por medio del glucómetro.

Dentro del análisis estadístico en el que se utilizó R y su paquete estadístico rstatix, primero se comprobó que no hay datos atípicos extremos, que los datos presentan una distribución normal (por medio de la prueba de normalidad Shapiro-Wilk), y que en general la mayoría no exhiben la misma varianza a lo largo de las distintas distribuciones de datos, por medio de la prueba de homocedasticidad de Levene (Anexos, Cuadros 3 y 4).

Luego se determinó, mediante la prueba estadística de comparación de promedios T de Welch (Anexos, Cuadros 5 y 6), que la única diferencia estadísticamente significativa existente (con un umbral Alfa de 0.05) en las condiciones estables o transitorias vs. la condición control para cada gen (Figuras 17 y 18) se observa en el tratamiento de glucosa transitoria 5 mM /5 mM en el Gen Nr1d1 con un valor  $p= 0.0004$  (Figura 18).

Figura 17: Diagrama de caja y bigotes de la expresión relativa de los genes Arntl, Dec1, Myc, Nr1d1 y Per1 de los tratamientos estables.



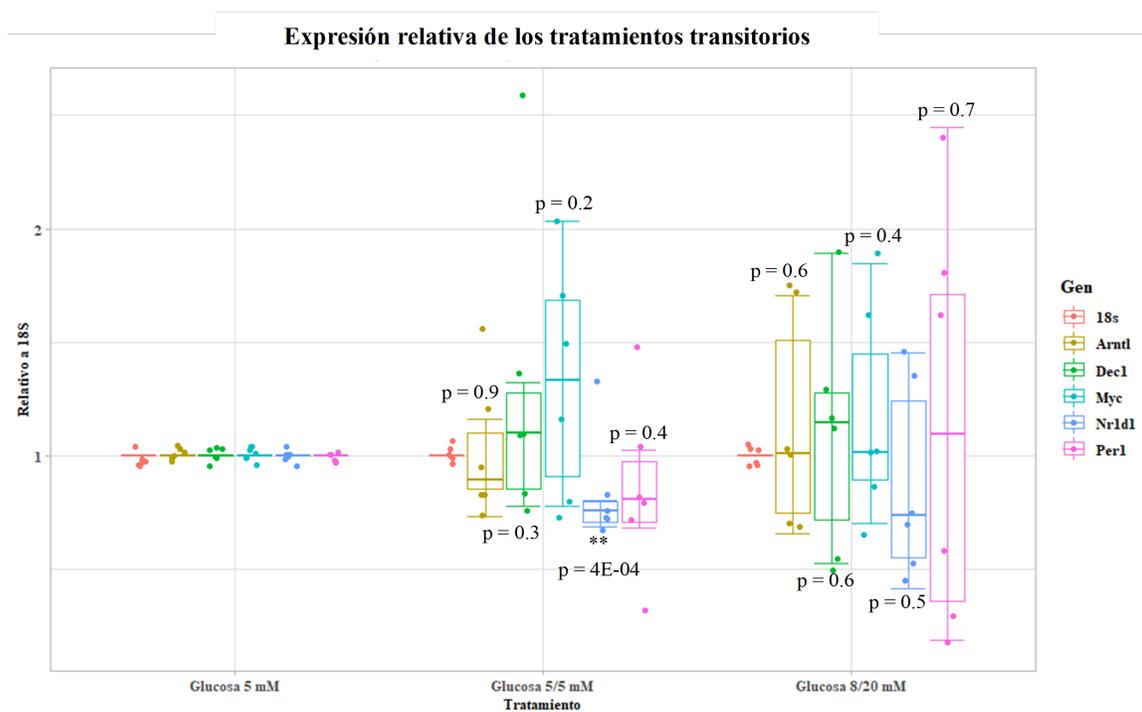
Expresión relativa determinada por PCR tiempo real de retrotranscripción usando SYBR® green en donde la expresión de los otros genes se comparó relativa al gen 18S en cada uno de los tratamientos estables de glucosa 8 mM y 20 mM, utilizando como referencia el tratamiento de glucosa 5 mM estable.

Los datos se obtuvieron a partir de  $N = 3$  experimentos independientes con  $n = 2$  replicas biológicas dentro de cada uno y los datos se presentaron como promedio  $\pm$  SEM a partir de  $n = 6$  experimentos con  $n = 1-2$  replicas cada uno. Donde ( $p = x$ ) se refiere al valor  $p$  dado por R, (#) la tendencia a aumentar la expresión de Dec1 en el tratamiento de glucosa 8 mM y (\*) valor  $p$  que muestra una diferencia significativa contra un alfa de 0.05 al comparar Arntl y Per1 dentro del mismo tratamiento (Glucosa estable 20 mM).

En los tratamientos estables de glucosa 20 mM y 8 mM resalta una posible diferencia entre la expresión de Per1 y Arntl, por lo que se prosiguió a analizar sus diferencias estadísticamente por medio de la prueba T de Welch (Figura 17). Aquí el valor  $p = 0.014$  fue menor al alfa de 0.05; por lo que muestra una diferencia estadísticamente significativa.

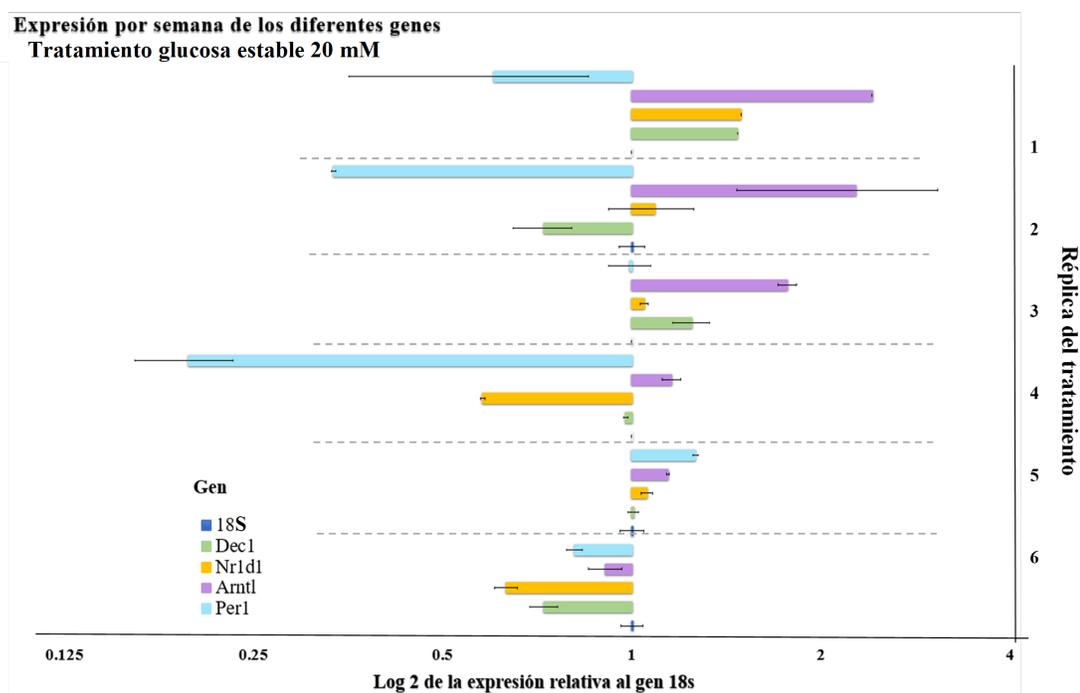
A partir de esto se decidió realizar una gráfica con las expresiones relativas de cada réplica experimental y gen de los tratamientos estables y transitorios a escala log2 con el fin de observar de una mejor manera los comportamientos de expresión individuales entre réplicas y observar las tendencias específicas (Figuras 19 y 20; anexos, Figuras 1 y 2).

Figura 18: Diagrama de caja y bigotes de la expresión relativa de los genes Arntl, Dec1, Myc, Nr1d1 y Per1 de los tratamientos transitorios.



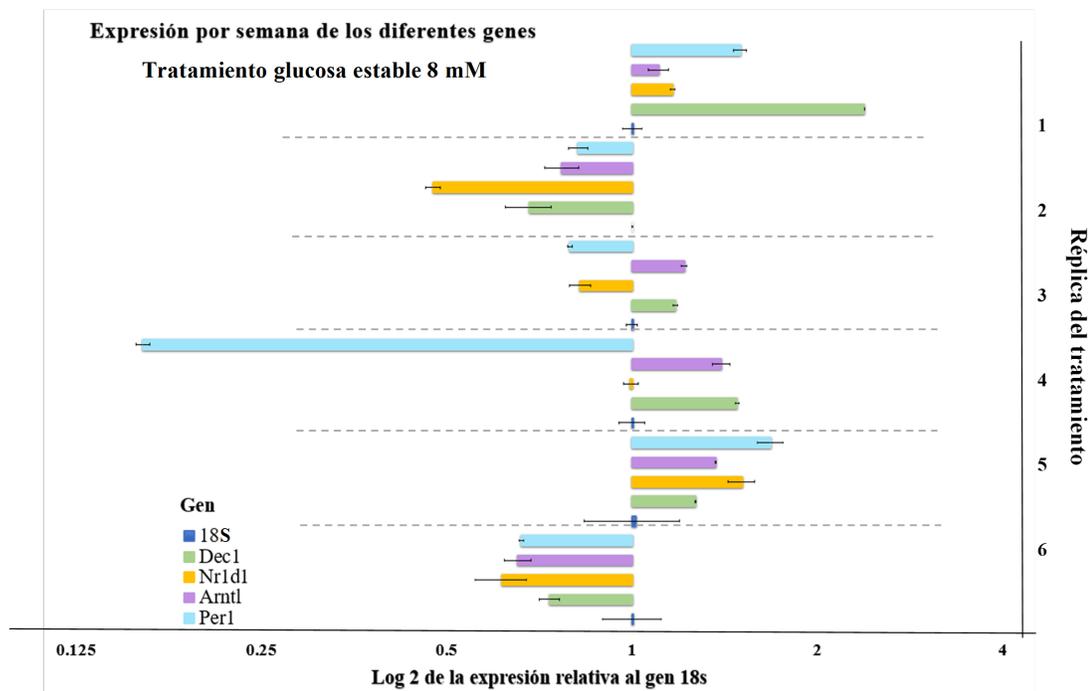
Expresión relativa determinada por PCR tiempo real de retrotranscripción usando SYBR® green en donde la expresión de los demás genes se comparó contra el gen 18S en cada uno de los tratamientos transitorios de glucosa 8 mM /20 mM y 5 mM/5mM utilizando como referencia el tratamiento de glucosa 5 mM estable. Los datos se obtuvieron a partir de N = 3 experimentos independientes con n = 2 replicas biológicas dentro de cada uno y los datos se presentaron como promedio ± SEM a partir de n = 6 experimentos con n = 1-2 replicas cada uno. Donde (p= x) se refiere al valor p dado por R y (\*\*) valor p que muestra una diferencia significativa contra un alfa de 0.05 en la expresión relativa del gen Nr1d1 en comparación al tratamiento de glucosa 5 mM estable.

Figura 19: Gráfica de barras a escala log2 de la expresión relativa en las réplicas del tratamiento glucosa estable 20 mM.



Aquí se observa la expresión relativa de cada una de las réplicas biológicas (n = 2) del tratamiento de glucosa estable 20 mM dentro de cada uno de experimentos independientes realizados (N=3) a una escala log2.

Figura 20: Gráfica de barras a escala log2 de la expresión relativa en las réplicas del tratamiento glucosa estable 8 mM.



Aquí se observa la expresión relativa de cada una de las réplicas biológicas ( $n = 2$ ) del tratamiento de glucosa estable 8 mM dentro de cada uno de experimentos independientes realizados ( $N=3$ ) a una escala log2.

## 7.1. Establecimiento de la línea celular

Al ser la diabetes una enfermedad de gran interés y preocupación a nivel mundial, su estudio y consideración dentro de las áreas de investigación en países como Guatemala tiene una gran importancia. Beta-TC-6 (ATCC® CRL11506™) es una línea celular de *Mus musculus* (ratón) adherente con un nivel de bioseguridad BSL2 importante como modelo celular en el estudio de la diabetes ya que son células  $\beta$  capaces de secretar insulina en respuesta a glucosa (ATCC, 2021). Este modelo no había sido utilizado antes en Guatemala como tampoco dentro de las instalaciones de la Universidad del Valle de Guatemala. Por lo que el objetivo principal de esta primera parte del estudio fue establecer esta línea dentro de los laboratorios de la Universidad para tener un primer modelo celular *in vitro* de esta enfermedad. Dentro de este estudio se determinó que, al ser cultivadas a una densidad de  $0.2 \times 10^6$  células/cm<sup>2</sup>, en DMEM (ATCC®) con 15 % de FBS (Gibco®) y 1 % Pen-strep (Gibco®), a 37 °C en una incubadora con 5 % de CO<sub>2</sub>, con cambios de medio cada 48 horas, estas células logran llegar a confluencia alta en los flasks T-25 (25 cm<sup>2</sup> de superficie) de aproximadamente 20 millones de células, lo que significa que las células se duplicaron dos veces ( $5 \times 10^6 * 2^2$ ), luego de 7 días de cultivo con una viabilidad >80% (Anexos, Cuadro 9). Esto tiene sentido ya que estas son células de crecimiento lento que, sembrando una densidad de  $0.4 \times 10^6$  células/cm<sup>2</sup>, pueden ser subcultivadas después de 2-3 días (Poitout y cols., 1995). Por lo que al haber sembrado  $0.2 \times 10^6$  células/cm<sup>2</sup> se esperaba alcanzar la confluencia necesaria para los subcultivos en aproximadamente una semana. Por lo que podemos decir que el establecimiento de la línea celular dio resultados positivos, abriendo la puerta a utilizar la misma en futuros proyectos dentro de la Universidad.

Sin embargo, vale la pena mencionar que este modelo celular, como la mayoría de los modelos *in vitro*, tiene sus beneficios y sus debilidades. Las células con las que se cuenta y que se lograron establecer, al tener un nivel de bioseguridad relativamente bajo, un crecimiento lento, fácil manejo y una capacidad de secreción de insulina en respuesta a los niveles de glucosa aún después de incluso 45 pasajes (Poitout y cols., 1995) es un modelo funcional y de importancia como parte de los primeros pasos en la investigación en el área de diabetes. Podemos resaltar que estas células poseen muchas similitudes a su contraparte en los islotes primarios, como el uso de ciertos elementos regulatorios y la expresión específica de Pd1x, aunque también poseen diferencias en diferentes

loci como también un transcriptoma enriquecido relacionado con procesos de proliferación celular (Lawlor, Youn, Kursawe, Ucar, y Stitzel, 2017). A pesar de esto, dependiendo de la magnitud de la investigación y las preguntas que quieran contestarse, se pueden ir requiriendo otras características que posean los islotes pancreáticos *in vivo* y que estas células no. Por lo que es importante tener en mente que más adelante pueda ser necesaria la modificación genética de las mismas, el uso de otra clase de suplementos, la utilización de otro tipo de células *in vitro*, como los islotes pancreáticos derivados de células madre pluripotentes, o incluso el uso de otros modelos de ratón (Brehm, Powers, Shultz, y Greimer, 2012; Joshi y cols., 2021; Leite y cols., 2020).

## 7.2. Análisis de expresión génica

Dentro de los esfuerzos actuales de la medicina regenerativa en el tema de diabetes se encuentra la comprensión molecular del proceso de maduración de los islotes pancreáticos (Drew, 2021; Helman y Melton, 2021). En donde se ha resaltado la importancia de Dec1 al unirse a promotores/potenciadores de genes mediadores del aumento del umbral de glucosa para la secreción de insulina (Alvarez-Dominguez, comunicación personal), y el papel que tiene el estado nutricional (Katsumoto y Grapin-Botton, 2020), incluyendo la activación de Dec1 (Alvarez-Dominguez y cols., 2020; Pastore y cols., 2019). Es por eso que dentro de esta parte del estudio se tuvieron dos objetivos principales. El primero fue lograr establecer e implementar un protocolo dinámico de “alimentación-ayuno” al manipular los niveles de glucosa entre los medios de cultivo. Esto se logró mediante la utilización de DMEM con glucosa a 5 mM (Corning®) el cual se suplementó utilizando una solución Stock de glucosa a 1 M. Para asegurar que los niveles de glucosa fueran los esperados, se midió la concentración de cada uno de los medios con ayuda de un glucómetro (Figura 16) donde se pudo verificar que, efectivamente, los medios elaborados tenían el nivel de glucosa requerido. El protocolo fue implementado exitosamente por tres semanas obteniendo así muestras en duplicado para cada uno de los tratamientos estables (5 mM, 8 mM, 20 mM) y transitorios (5 mM /5 mM y 8mM / 20 mM) por cada semana, teniendo así en total 6 réplicas por tratamiento. Esto abre las puertas al uso de este tipo de protocolos en diferentes estudios en donde el estado nutricional tenga una posible influencia.

Como segundo objetivo se tuvo evaluar los cambios en la transcripción de Dec1, debido a la importancia resaltada previamente de este en islotes pancreáticos bajo los protocolos implementados. Al evaluar la transcripción de este gen bajo diferentes tratamientos nutricionales, incluyendo los transitorios que simulan la “alimentación-ayuno”, también se incluyeron otros genes circadianos de interés (Métodos, Cuadro 5) entre los que se encuentran moduladores periféricos (Nr1d1 y Myc) y componentes centrales (Arntl y Per1) del reloj circadiano. Estos genes nos ayudaron a evaluar si los tratamientos en realidad están funcionando como una señal (*Zeitgeber*) para sincronización circadiana en las células (Mason, Qian, Adler, y Scheer, 2020; Qian y Scheer, 2016), ya que estos presentan un comportamiento antifásico entre activadores (Arntl) y represores (Per1 y Nr1d1) durante el ciclo de 24 hrs (Bass y Takahashi, 2010). Para evaluar si existen diferencias en transcripción, se decidió utilizar PCR en tiempo real de retrotranscripción, ya que este método ha mostrado ser muy poderoso para cuantificar expresión génica (Livak y Schmittgen, 2001). Para esto se requirió extracción previa de ARN de las células, seguido de la síntesis de ADNc. Los distintos rendimientos de la extracción de ARN pueden observarse en Anexos (Cuadro 2), donde cabe resaltar que aunque los rendimientos fueron bastante variados entre las distintas extracciones, la pureza determinada a través de la proporción A260/A280 de todas las extracciones se encuentra arriba de 2.0, por lo que concluimos que dentro del ARN extraído no había contaminación por proteínas acarreadas durante todo el proceso (Cicinnati y cols., 2008).

Luego se prosiguió a validar los *primers* de PCR a utilizar mediante un gel de agarosa 2 % (Figura 15). Los tamaños de los amplicones coincidieron con el tamaño esperado (determinados mediante alineación de *primers* con su secuencia objetivo en Primer3 y BLAST), además de observar una sola banda clara para cada uno de los genes. Por lo que se puede inferir que no existe ruido en la

amplificación, como el que se observaría al tener *primers dimers* (Boeuf y cols., 2005; Spandidos y cols., 2008).

Finalmente, mediante los Ct obtenidos de las 3 semanas de tratamientos a través del PCR tiempo real de retrotranscripción utilizando SYBR® green como tinte, se obtuvo la expresión relativa de cada uno de los genes de interés. Esta se graficó con diagramas de caja y bigotes en R (Figuras 17 y 18). Debido a lo reportado anteriormente en la literatura (Ballabio y Bonifacino, 2020; Honma y cols., 2002), dentro de este estudio se esperaba que, en el tratamiento transitorio de 8 mM / 20 mM de glucosa, se lograra observar un aumento significativo en la expresión de Dec1, debido a la maduración funcional provocada por el cambio nutricional y el potencial papel que juega mTORC1 y TFEB en su expresión (Ballabio y Bonifacino, 2020; Helman y cols., 2020). Sin embargo, no se logró observar nada consistente en la expresión de Dec1 entre los diferentes tratamientos transitorios. Esto lo podemos relacionar con el hecho de que, al ser un gen circadiano, el cual ha evidenciado picos de expresión en el medio del ciclo circadiano de 24 horas (~12hrs), en los puntos extremos de este ciclo (p.ej. 0hr, 24hr), no se encuentra mayor diferencia en su expresión, por lo que al hacer una sola medición durante el día no podemos saber con precisión si Dec1 está en su punto máximo de expresión o en alguno de los extremos sin cambios significativos. Esto podría ser una explicación del por qué dentro de los tratamientos no se ve ningún pico alto de expresión como se esperaba (Honma y cols., 2002; Landgraf, McCarthy, y Welsh, 2014).

Es por esto que se recomienda realizar otro estudio en donde las mediciones de expresión de Dec1 se realicen durante distintas horas del día (7 am, 11 am, 3 pm, 7 pm, 11 pm y 3 am) luego de que las células sean sometidas a los tratamientos de “alimentación-ayuno” para poder encontrar si existe o no un pico alto de expresión en las células sometidas a estos en comparación a las células control y así comprobar si, efectivamente, este tratamiento es capaz de impulsar un fenotipo maduro o no. Lo cual tiene relevancia en la generación de conocimiento para los actuales tratamientos de maduración de islotes pancreáticos generados a partir de células madre y la posible implicación de Dec1 en estos procesos (Alvarez-Domínguez y cols., 2020). Sin embargo, también debe considerarse la posibilidad de que el comportamiento a observar dentro de este otro estudio no sea el esperado debido a diferencias transcripcionales antes mencionadas entre esta línea celular y los islotes pancreáticos (Lawlor y cols., 2017).

Por otro lado, al evaluar la expresión de Dec1 entre los tratamientos de glucosa estable (8 mM y 20 mM) se puede observar un comportamiento interesante. En el tratamiento de glucosa 8 mM se observa que Dec1 empieza a tener una tendencia a aumentar su expresión respecto al control que no puede verse en el tratamiento de glucosa 20 mM (Figura 17, #). Este comportamiento también lo podemos confirmar en la Figura 20, en donde 4 de las 6 réplicas de este tratamiento (glucosa 8 mM) muestran una expresión regulada positivamente (crecimiento hacia la derecha). Esto nos llama la atención debido a que las células antes de ser sometidas a estos tratamientos se mantuvieron con una alimentación constante de glucosa 25 mM, que al ser cambiado a glucosa 8 mM podría interpretarse en estas células como entrar en un estado nutricional de ayuno (mayor que al bajar únicamente de 25 mM a 20 mM). Lo que podría indicarnos que, al someter estas células a un estado nutricional de ayuno drástico (shock nutricional muy pronunciado) por 3 días, la expresión de Dec1 se ve aumentada. Lo cual tiene sentido con nuestra hipótesis inicial: En condiciones de ayuno, la actividad del complejo mTORC1 es suprimida permitiendo la translocación del factor de transcripción EB al núcleo, donde promueve la expresión de Dec1. Y aunque su valor P ( $p = 0.3$ ) no nos indica que exista una diferencia significativa contra un alfa de 0.05, empezamos a notar esta tendencia al cambio.

A partir de este comportamiento observado se propone otro estudio, en el que las células sean expuestas a una disminución en gradiente de la concentración de glucosa (p.ej. luego de un mantenimiento de 25 mM someter a las células a 3 días de tratamientos distintos de glucosa 25 mM, 20 mM, 15 mM, 10 mM, 8 mM y 5 mM). Esto para comprobar si, en efecto, entre más grande sea esta disminución de glucosa (ayuno) mayor es la expresión de Dec1. Además, si logra comprobarse este comportamiento, como segundo paso se recomendaría evaluar si este aumento de expresión de

algún modo induce a la maduración de estas células. Para lo cual se podría evaluar y cuantificar su secreción de insulina a diferentes concentraciones de glucosa utilizando un gradiente empezando desde 2.8 mM y aumentando a 5 mM, 8 mM, 10 mM, 12 mM, 16 mM y 20 mM (Llanos y cols., 2015). Esto al evaluarlo en las células con y sin efecto en la expresión de Dec1 debido cambios en el estado nutricional nos podría indicar si estos promueven o no esta maduración. Ya que, según la literatura y lo planteado en este estudio, la expresión de Dec1 promovería la maduración de estas células pancreáticas aumentando la cantidad de insulina secretada y el umbral de detección de glucosa al que responden (Liu y Hebrok, 2017).

Al evaluar los demás resultados dentro de estos tratamientos estables no pudimos encontrar ninguna diferencia que superara el umbral estadístico de significancia de 0.05 para los otros genes evaluados, sin embargo, resaltó una posible diferencia entre la expresión de Per1 y Arntl en los tratamientos estables de glucosa 20 y 8 mM (en comparación con el de glucosa 5 mM estable). El comportamiento es un cambio de expresión posiblemente antifásico, en donde Arntl (activador) muestra una mayor expresión mientras que Per1 (represor) muestra una expresión menor (relativa a la expresión del gen 18S) (Figura 17), lo cual sugiere el comportamiento circadiano oscilatorio común entre estos dos genes (Nishide y cols., 2006; J. S. Takahashi, 2017). En este comportamiento, puede observarse que la diferencia entre Arntl y Per1 se va volviendo más notable conforme la cantidad de glucosa estable a la que las células fueron sometidas va subiendo. Sin embargo, al realizar la prueba T de Welch con los parámetros por defecto en R, luego de comprobar que por lo general todos los datos muestreados tienen una distribución normal, pero no varianza constante (Anexos, Cuadros 3 y 4), estos no alcanzan diferencias estadísticas significativas en comparación al tratamiento de glucosa 5 mM estable, pero muestran valores cercanos: para el tratamiento estable de glucosa 20 mM, el valor p de Arntl ( $p = 0.07$ ) y Per1 ( $p = 0.13$ ) vs. un alfa de 0.05. A partir de esto, se decidió comparar la expresión entre estos dos genes en el tratamiento estable de glucosa 20mM, dando un valor  $p = 0.014$ , el cual contra un alfa de 0.05, muestra una diferencia estadísticamente significativa lo que confirma esta tendencia observada.

También se esperaba observar un comportamiento antifásico similar entre Arntl (activador) y Nr1d1 (represor) (Zhang y Kay, 2010). Este comportamiento no se logra observar tan marcado como con Per1 en los tratamientos estables, sin embargo es en el tratamiento estable de glucosa 20 mM en el que se muestra la diferencia más grande entre los promedios de expresión de ambos genes aunque sin diferencia estadística significativa pero con un valor p muy cercano a serlo (valor  $p = 0.0584$  vs. un alfa de 0.05). Además se ve una diferencia estadísticamente significativa en los tratamientos transitorios (Figura 18) de Nr1d1 en el tratamiento de glucosa 5 mM / 5 mM en comparación al control glucosa 5 mM con un valor  $p = 0.0004$  vs. un alfa de 0.05. Esta diferencia también la podemos observar en la gráfica de barras a escala log2 de este tratamiento (Anexos, Figura 1) en donde se ve que en 5 de los 6 casos, Nr1d1 se ve regulado negativamente (crecimiento hacia la izquierda). No obstante, en comparación con Arntl en este caso no se obtiene una diferencia estadística significativa (valor  $p = 0.375$  vs. un alfa de 0.05) por lo que no podemos asociar esta observación completamente al comportamiento antifásico esperado. Sin embargo, debido a que en este estudio únicamente se evaluó la expresión a una misma hora del día (7 am), se recomienda realizar otro en el que la expresión se mida dos veces, una por la mañana y otra por la noche (7 am y 7 pm), con el fin de comprobar si el comportamiento que se está observando sea, en efecto, el contrario (antifásico) en los distintos puntos del día (como es de esperarse con genes circadianos y células sincronizadas).

Para evaluar la tendencia a este comportamiento antifásico dentro de los tratamientos estables se graficó la expresión relativa (promedio  $\pm$  SEM) de cada una de las réplicas de cada tratamiento (Glucosa 8 mM y 20 mM) a escala logarítmica base 2 o log2 (Figuras 19 y 20). Esto nos permite ver gráficamente el comportamiento de disminución en la expresión o regulación negativa (crecimiento hacia el lado izquierdo) de los represores cuando hay alta expresión o regulación positiva (crecimiento hacia lado derecho) de los activadores. En este caso, la tendencia antifásica observada en el tratamiento estable de glucosa 20 mM en el diagrama de caja y bigotes (Figura 17) se confirma al ver que en la mayoría de réplicas (4 de 6) se ve este comportamiento contrario (Figura 19). Mientras que en la Figura 20 del tratamiento de glucosa estable 8 mM solo en 2 de los 6 casos se puede observar

este comportamiento.

Además, cabe resaltar que nuestro muestreo estadístico fue de  $N = 3$  experimentos independientes con  $n = 2$  replicas biológicas dentro de cada uno. Dentro de las cuales los datos se presentaron como promedio  $\pm$  SEM a partir de  $n = 6$  experimentos con  $n = 1-2$  replicas cada uno. A partir de estas se realizó el análisis de varianza. Este muestreo es relativamente pequeño, lo cual lleva a tener un poder estadístico no tan alto para lograr distinguir diferencias más pequeñas. Esto podría ser una de las razones por las cuales algunas diferencias observadas en la expresión de los genes no alcanzan significancia estadística. A partir de los datos recabados dentro de este estudio se estima que para aumentar este a 0.8 (alto) se recomienda incrementar el número de muestra a 24 (Soper, 2022). Por ejemplo, esto se podría lograr aumentando el número de repeticiones por semana de tratamiento a 8 y tomando cada una de las repeticiones como individuos separados.

Una de las características importantes a resaltar del reloj circadiano es que se encuentra intrínsecamente dentro de todas las células. En cultivo celular, sin embargo, cada célula puede mantener su propio ciclo circadiano independientemente a las demás, lo que significa que estas no se encontrarán sincronizadas, por lo que la expresión de genes puede ser heterogénea entre las células de un mismo cultivo (Ndikung y cols., 2020). La desincronización puede ser otra explicación por la cual dentro de este estudio se ve que, en algunos tratamientos, como los transitorios, no se alcanza diferencia estadística significativa en la expresión de genes circadianos, mientras que en los tratamientos estables se empieza a ver una, siendo el de glucosa 20 mM el más notorio. Y aunque en otros estudios (Seshadri y Doucette, 2021) se utiliza forskolina o dexametasona como agentes de sincronización del reloj circadiano, en cultivo de islotes pancreáticos u otras células *in vitro*, también es posible que esta sincronización se genere al someter las células a ciclos nutricionales como los de “alimentación y ayuno” ya que la alimentación ha demostrado ser una señal o “Zeitgeber” bastante fuerte para la sincronización circadiana en ciertas células con relación metabólica (Mason y cols., 2020). Sin embargo, al evaluar la expresión de genes circadianos utilizando protocolos transitorios sin que el tratamiento, que es lo que está simulando los periodos de nutrición-ayuno, haya sincronizado completamente a las células se obtiene mucha variabilidad en las distintas mediciones de expresión y oscilaciones no consistentes (Gagliano y cols., 2021), lo cual se puede observar en el tratamiento de glucosa 8 mM /20 mM transitoria en la Figura 18 donde por la misma variabilidad se muestra un promedio muy similar a los controles.

Por lo que una recomendación para tomar en cuenta en base a estas observaciones sobre la sincronización de las células es el hacer una evaluación de la expresión génica a través del tiempo de exposición a los tratamientos. Para determinar si la sincronización mejora con relación al tiempo que las células pasan dentro de los tratamientos. A este otro estudio se sugiere agregarle como paso inicial un periodo de 24 hrs de reposo a una concentración de glucosa 5 mM antes de iniciar cualquier tratamiento. En este caso se propone la recolección de ARN al menos dos veces al día dentro del ciclo de 24 horas desde el día 1 hasta el día 4 de tratamientos para evaluar expresión de los genes en el tiempo. Además, vale la pena recomendar la utilización de otros genes *housekeeping* para la determinación de la expresión relativa con el fin de identificar si existe otro u otros genes que puedan modelar de una mejor manera estas diferencias en la expresión al ser más estables (Cherubini, Rusconi, y Lazzari, 2021).

También es importante mencionar que, como otro estudio de seguimiento a este, se puede monitorear la expresión tanto de Dec1 como de los demás genes circadianos a nivel de proteínas. Esto por medio de la detección y cuantificación de las proteínas que los genes codifican a través de pruebas inmonoquímicas como *Western blot* (Rivera-Torres, 2015), ya que al implementar más métodos y protocolos dentro de estos estudios se permitirá tener resultados más robustos y mejores oportunidades de desarrollo e investigación. Además, el poder evaluar de una forma exitosa genes circadianos y su comportamiento llega a ser importante no solo para este estudio, sino para el estudio de otras enfermedades en las que un ciclo circadiano trastornado ha mostrado tener relación, como en el caso de enfermedades mentales, nutricionales o cerebrales (Logan y McClung, 2019; Panda, 2016).

Por último, podemos concluir que este estudio no solo abre las puertas a la investigación en biología celular, diabetes y ciclos circadianos para los estudiantes de la Universidad del Valle de Guatemala u otras partes interesadas, sino que también deja abiertas otras preguntas sobre la sincronización de las células y la medición del pico de expresión de Dec1, que pueden retomarse en otros estudios, o incluso generar otras preguntas que puedan aportar no solo nuevos conocimientos de enfermedades como la diabetes (o del reloj circadiano), sino también impulsar la investigación en áreas como la medicina regenerativa.

---

### Conclusiones

---

1. Se logró el establecer y mantener la línea celular Beta-TC-6 ATCC® CRL11506™ de *Mus musculus* dentro de la Universidad del Valle de Guatemala.
2. La extracción de ARN y síntesis de ADNc de la línea celular establecida dentro del laboratorio fue desarrollada de manera exitosa.
3. Fue posible amplificar los fragmentos de ADNc esperados de los genes 18S, Arntl, Per1, Nr1d1, Dec1 y Myc a través del PCR en tiempo real utilizando SYBR® green.
4. No se encontró un cambio estadísticamente significativo en la expresión de Dec1 entre los tratamientos estables o transitorios. Sin embargo, se pudo observar una tendencia al aumento de su expresión en el tratamiento de glucosa estable 8 mM asociandolo con un ayuno prolongado.
5. Se pudo observar un posible comportamiento antifásico en los genes Arntl, Per1 y Nr1d1 en el tratamiento de glucosa estable 20 mM. La diferencia de expresión entre Arntl y Per1 es estadísticamente significativa ( $p=0.014 < 0.05$ ), mientras que entre Arntl y Nr1d1 no ( $p=0.0584$ ), pero se muestra una tendencia muy cercana a serlo.

---

### Recomendaciones

---

1. Comparar diferentes métodos de extracción de ARN para determinar el método con mejor rendimiento para las células Beta-TC-6.
2. Evaluar otros genes *housekeeping* en la determinación de la expresión relativa con el fin de identificar si existe alguno mejor para este modelo.
3. Evaluar, mediante un protocolo de tratamientos estables con una disminución de glucosa en gradiente, si entre más drástica es la disminución de la concentración de glucosa en células mantenidas a una concentración de glucosa 25 mM la expresión de Dec1 se ve aumentada.
4. Comprobar si un aumento en la expresión de Dec1 en estas células significa o no la maduración funcional de las mismas al comparar la secreción de insulina en respuesta a diferentes concentraciones de glucosa empezando desde glucosa 2.8 mM aumentando en gradiente hasta glucosa 20 mM.
5. Realizar la colección de ARN para la evaluación de la expresión génica de Dec1 y los demás genes circadianos de interés a diferentes horas del día. por ejemplo, cada 4 horas durante un ciclo de 24 hrs después de los tratamientos para determinar si los comportamientos circadianos observados son en realidad antifásicos y si existe o no un pico alto de expresión de Dec1.
6. Aumentar el número de muestras recolectadas para aumentar el poder de los análisis estadísticos.
7. Evaluar la expresión génica a través del tiempo de exposición a los tratamientos, con el fin de determinar si en realidad el tiempo es un factor influyente en la sincronización circadiana en las células a través de los cambios nutricionales.
8. Evaluar la expresión génica a nivel de proteína, por medio de extracciones proteicas y pruebas inmunológicas.

- Alvarez-Dominguez, J. R., Donaghey, J., Rasouli, N., Kenty, J. H. R., Helman, A., Charlton, J., ... Melton, D. A. (2020). Circadian entrainment triggers maturation of human in vitro islets [Journal Article]. *Cell Stem Cell*, 26(1), 108-122.e10. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31839570> doi: 10.1016/j.stem.2019.11.011
- Ashcroft, F. M., y Rorsman, P. (2012). Diabetes mellitus and the  $\beta$ cell: the last ten years [Journal Article]. *Cell*, 148(6), 1160-71. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22424227> doi: 10.1016/j.cell.2012.02.010
- ATCC. (2014). *Atcc animal cell culture guide*. American Type Culture Collection Manassas, VA, USA.
- ATCC. (2021). *Beta-tc-6 crl-11506™ - product sheet*. American Type Culture Collection Manassas, VA, USA.
- Ballabio, A., y Bonifacino, J. S. (2020). Lysosomes as dynamic regulators of cell and organismal homeostasis [Journal Article]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 21(2), 101-118. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31768005> doi: 10.1038/s41580-019-0185-4
- Bass, J., y Takahashi, J. S. (2010). Circadian integration of metabolism and energetics [Journal Article]. *Science*, 330(6009), 1349-54. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21127246> doi: 10.1126/science.1195027
- Bassett, M. T. (2005). Diabetes is epidemic [Journal Article]. *Am J Public Health*, 95(9), 1496. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16211717> doi: 10.2105/ajph.95.9.1496
- Bellin, M. D., Barton, F. B., Heitman, A., Harmon, J. V., Kandaswamy, R., Balamurugan, A. N., ... Hering, B. J. (2012). Potent induction immunotherapy promotes long-term insulin independence after islet transplantation in type 1 diabetes [Journal Article]. *Am J Transplant*, 12(6), 1576-83. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22494609> doi: 10.1111/j.1600-6143.2011.03977.x
- Bioquest, A. (2021a). *Pbs (phosphate buffered saline) (1x, ph 7.4) preparation and recipe*.
- Bioquest, A. (2021b). *Te buffer 10x preparation and recipe*.
- Blum, B., Hrvatin, S., Schuetz, C., Bonal, C., Rezanian, A., y Melton, D. A. (2012). Functional beta-cell maturation is marked by an increased glucose threshold and by expression of urocortin 3 [Journal Article]. *Nat Biotechnol*, 30(3), 261-4. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22371083> doi: 10.1038/nbt.2141

- Boeuf, P., Vigan-Womas, I., Jublot, D., Loizon, S., Barale, J. C., Akanmori, B. D., ... Behr, C. (2005). Cyproquant-pcr: a real time rt-pcr technique for profiling human cytokines, based on external rna standards, readily automatable for clinical use [Journal Article]. *BMC Immunol*, 6, 5. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15748278> doi: 10.1186/1471-2172-6-5
- Brehm, M. A., Powers, A. C., Shultz, L. D., y Greiner, D. L. (2012). Advancing animal models of human type 1 diabetes by engraftment of functional human tissues in immunodeficient mice [Journal Article]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(5), a007757. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22553498> (Brehm, Michael A Powers, Alvin C Shultz, Leonard D Greiner, Dale L 2012/5/4) doi: 10.1101/cshperspect.a007757
- Cherubini, A., Rusconi, F., y Lazzari, L. (2021). Identification of the best housekeeping gene for rt-qpcr analysis of human pancreatic organoids. *PLoS one*, 16(12), e0260902.
- Cicinnati, V. R., Shen, Q., Sotiropoulos, G. C., Radtke, A., Gerken, G., y Beckebaum, S. (2008). Validation of putative reference genes for gene expression studies in human hepatocellular carcinoma using real-time quantitative rt-pcr [Journal Article]. *BMC Cancer*, 8, 350. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19036168> doi: 10.1186/1471-2407-8-350
- Core Team, R., y cols. (2016). The r project for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria*.
- Cryer, P. E. (2008). The barrier of hypoglycemia in diabetes [Journal Article]. *Diabetes*, 57(12), 3169-76. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19033403> doi: 10.2337/db08-1084
- Dabelea, D., Mayer-Davis, E. J., Saydah, S., Imperatore, G., Linder, B., Divers, J., ... others (2014). Prevalence of type 1 and type 2 diabetes among children and adolescents from 2001 to 2009. *Jama*, 311(17), 1778-1786.
- DeFronzo, R., Fleming, G. A., Chen, K., y Bicsak, T. A. (2016). Metformin-associated lactic acidosis: Current perspectives on causes and risk [Journal Article]. *Metabolism*, 65(2), 20-9. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26773926> doi: 10.1016/j.metabol.2015.10.014
- Drew, L. (2021). How stem cells could fix type 1 diabetes. *Nature*, 595(7867), S64-S66.
- Eguizabal, C., Aran, B., Chuva de Sousa Lopes, S. M., Geens, M., Heindryckx, B., Panula, S., ... Veiga, A. (2019). Two decades of embryonic stem cells: a historical overview [Journal Article]. *Hum Reprod Open*, 2019(1), hoy024. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30895264> doi: 10.1093/hropen/hoy024
- Gagliano, O., Luni, C., Li, Y., Angiolillo, S., Qin, W., Panariello, F., ... Elvassore, N. (2021). Synchronization between peripheral circadian clock and feeding-fasting cycles in microfluidic device sustains oscillatory pattern of transcriptome [Journal Article]. *Nature Communications*, 12(1). Descargado de <https://dx.doi.org/10.1038/s41467-021-26294-9> doi: 10.1038/s41467-021-26294-9
- Helman, A., Cangelosi, A. L., Davis, J. C., Pham, Q., Rothman, A., Faust, A. L., ... Melton, D. A. (2020). A nutrient-sensing transition at birth triggers glucose-responsive insulin secretion [Journal Article]. *Cell Metab*, 31(5), 1004-1016.e5. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32375022> doi: 10.1016/j.cmet.2020.04.004
- Helman, A., y Melton, D. A. (2021). A stem cell approach to cure type 1 diabetes [Journal Article]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 13(1). Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32122884> doi: 10.1101/cshperspect.a035741
- Honma, S., Kawamoto, T., Takagi, Y., Fujimoto, K., Sato, F., Noshiro, M., ... Honma, K. (2002). Dec1 and dec2 are regulators of the mammalian molecular clock [Journal Article]. *Nature*, 419(6909), 841-4. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12397359> doi: 10.1038/nature01123
- IDF, I. D. F. (2021). *Idf diabetes atlas* [Electronic Book]. Descargado de <https://diabetesatlas.org/atlas/tenth-edition>
- IDT. (2017). *Tips for resuspending and diluting your oligonucleotides*.
- Joshi, K., Cameron, F., Tiwari, S., Mannering, S. I., Elefanty, A. G., y Stanley, E. G. (2021). Modeling type 1 diabetes using pluripotent stem cell technology [Journal Article]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 12, 635662. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33868170>

- (Joshi, Kriti Cameron, Fergus Tiwari, Swasti Mannering, Stuart I Elefanty, Andrew G Stanley, Edouard G 2021/4/20) doi: 10.3389/fendo.2021.635662
- Kassambara, A. (2019). *Comparing groups: Numerical variables*. Datanovia.
- Kassambara, A. (2021). *rstatix: Pipe-friendly framework for basic statistical tests (r package version 0.7. 0)[computer software]*.
- Katsumoto, K., y Grapin-Botton, A. (2020). Nutrients men-tor -cells to adulthood [Journal Article]. *Dev Cell*, 54(2), 140-141. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32693054> doi: 10.1016/j.devcel.2020.06.028
- Kreslavsky, T., Vilagos, B., Tagoh, H., Poliakova, D. K., Schwickert, T. A., Wöhner, M., ... Busslinger, M. (2017). Essential role for the transcription factor bhlhe41 in regulating the development, self-renewal and bcr repertoire of b-1a cells [Journal Article]. *Nat Immunol*, 18(4), 442-455. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28250425> doi: 10.1038/ni.3694
- Landgraf, D., McCarthy, M. J., y Welsh, D. K. (2014). Circadian clock and stress interactions in the molecular biology of psychiatric disorders [Journal Article]. *Curr Psychiatry Rep*, 16(10), 483. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25135782> (Landgraf, Dominic McCarthy, Michael J Welsh, David K 2014/8/20) doi: 10.1007/s11920-014-0483-7
- Latres, E., Finan, D. A., Greenstein, J. L., Kowalski, A., y Kieffer, T. J. (2019). Navigating two roads to glucose normalization in diabetes: Automated insulin delivery devices and cell therapy [Journal Article]. *Cell Metab*, 29(3), 545-563. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30840911> doi: 10.1016/j.cmet.2019.02.007
- Lawlor, N., Youn, A., Kursawe, R., Ucar, D., y Stitzel, M. L. (2017). Alpha tc1 and beta-tc-6 genomic profiling uncovers both shared and distinct transcriptional regulatory features with their primary islet counterparts [Journal Article]. *Sci Rep*, 7(1), 11959. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28931935> (Lawlor, Nathan Youn, Ahrim Kursawe, Romy Ucar, Duygu Stitzel, Michael L 2017/9/22) doi: 10.1038/s41598-017-12335-1
- Leite, N. C., Sintov, E., Meissner, T. B., Brehm, M. A., Greiner, D. L., Harlan, D. M., y Melton, D. A. (2020). Modeling type 1 diabetes in vitro using human pluripotent stem cells [Journal Article]. *Cell Rep*, 32(2), 107894. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32668238> (Leite, Nayara C Sintov, Elad Meissner, Torsten B Brehm, Michael A Greiner, Dale L Harlan, David M Melton, Douglas A 2020/7/16) doi: 10.1016/j.celrep.2020.107894
- Lemaire, K., Thorrez, L., y Schuit, F. (2016). Disallowed and allowed gene expression: Two faces of mature islet beta cells [Journal Article]. *Annu Rev Nutr*, 36, 45-71. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27146011> doi: 10.1146/annurev-nutr-071715-050808
- Liu, J. S., y Hebrok, M. (2017). All mixed up: defining roles for -cell subtypes in mature islets [Journal Article]. *Genes Dev*, 31(3), 228-240. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28270515> doi: 10.1101/gad.294389.116
- Livak, K. J., y Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the 2(-delta delta c(t)) method [Journal Article]. *Methods*, 25(4), 402-8. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609> doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Llanos, P., Contreras-Ferrat, A., Barrientos, G., Valencia, M., Mears, D., y Hidalgo, C. (2015). Glucose-dependent insulin secretion in pancreatic  $\beta$ -cell islets from male rats requires ca2+ release via ros-stimulated ryanodine receptors. *PLoS One*, 10(6), e0129238.
- Logan, R. W., y McClung, C. A. (2019). Rhythms of life: circadian disruption and brain disorders across the lifespan [Journal Article]. *Nat Rev Neurosci*, 20(1), 49-65. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30459365> (Logan, Ryan W McClung, Colleen A 2018/11/22) doi: 10.1038/s41583-018-0088-y
- Marcheva, B., Ramsey, K. M., Buhr, E. D., Kobayashi, Y., Su, H., Ko, C. H., ... Bass, J. (2010). Disruption of the clock components clock and bmal1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes [Journal Article]. *Nature*, 466(7306), 627-31. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20562852> doi: 10.1038/nature09253
- Mason, I. C., Qian, J., Adler, G. K., y Scheer, F. A. J. (2020). Impact of circadian disruption on glucose metabolism: implications for type 2 diabetes [Journal Article]. *Diabetologia*, 63(3), 462-472. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31915891> (Mason, Ivy C

- Qian, Jingyi Adler, Gail K Scheer, Frank A J L (2020/1/10) doi: 10.1007/s00125-019-05059-6
- Millman, J. R., y Pagliuca, F. W. (2017). Autologous pluripotent stem cell-derived  $\beta$ -like cells for diabetes cellular therapy [Journal Article]. *Diabetes*, 66(5), 1111-1120. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28507211> doi: 10.2337/db16-1406
- MSPAS. (2015). *Análisis de la situación epidemiológica de enfermedades no transmisibles guatemala 2015* [Government Document]. Descargado de <http://epidemiologia.mspas.gob.gt/files/Publicaciones/Semanas%20Situacional/asis%20ent%202015.pdf>
- MSPAS. (2020). *La diabetes: Tipos, incidencia y factores de riesgo ¿quiénes son los más afectados?* (Vol. 2021) [Blog]. Descargado de <https://www.mspas.gob.gt/noticias/noticias-ultimas/5-noticias-mspas/1127-la-diabetes-tipos,-incidencia-y-factores-de-riesgo-%C2%BFquiénes-son-los-m%C3%A1s-afectados.html>
- Nair, G. G., Tzanakakis, E. S., y Hebrok, M. (2020). Emerging routes to the generation of functional  $\beta$ -cells for diabetes mellitus cell therapy. *Nature Reviews Endocrinology*, 1–13.
- Nathan, D. M., Buse, J. B., Davidson, M. B., Ferrannini, E., Holman, R. R., Sherwin, R., y Zinman, B. (2009). Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: A consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: A consensus statement of the american diabetes association and the european association for the study of diabetes [Journal Article]. *Diabetes Care*, 32(1), 193-203. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2606813> doi: 10.2337/dc08-9025
- Ndikung, J., Storm, D., Violet, N., Kramer, A., Schönfelder, G., Ertych, N., y Oelgeschläger, M. (2020). Restoring circadian synchrony in vitro facilitates physiological responses to environmental chemicals [Journal Article]. *Environ Int*, 134, 105265. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31734582> doi: 10.1016/j.envint.2019.105265
- Nishide, S. Y., Honma, S., Nakajima, Y., Ikeda, M., Baba, K., Ohmiya, Y., y Honma, K. (2006). New reporter system for per1 and bmal1 expressions revealed self-sustained circadian rhythms in peripheral tissues [Journal Article]. *Genes Cells*, 11(10), 1173-82. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16999737> doi: 10.1111/j.1365-2443.2006.01015.x
- Pagliuca, F. W., Millman, J. R., Gürtler, M., Segel, M., Van Dervort, A., Ryu, J. H., ... Melton, D. A. (2014). Generation of functional human pancreatic  $\beta$ cells in vitro [Journal Article]. *Cell*, 159(2), 428-39. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25303535> doi: 10.1016/j.cell.2014.09.040
- Pan, F. C., y Brissova, M. (2014). Pancreas development in humans [Journal Article]. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 21(2), 77-82. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24569548> doi: 10.1097/MED.0000000000000047
- Pan, F. C., y Wright, C. (2011). Pancreas organogenesis: from bud to plexus to gland. *Developmental Dynamics*, 240(3), 530–565.
- Panda, S. (2016). Circadian physiology of metabolism [Journal Article]. *Science*, 354(6315), 1008-1015. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27885007> doi: 10.1126/science.aah4967
- Pastore, N., Vainshtein, A., Herz, N. J., Huynh, T., Brunetti, L., Klisch, T. J., ... Ballabio, A. (2019). Nutrient-sensitive transcription factors tfeb and tfe3 couple autophagy and metabolism to the peripheral clock [Journal Article]. *EMBO J*, 38(12). Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31126958> doi: 10.15252/embj.2018101347
- Poitout, V., Stout, L. E., Armstrong, M. B., Walseth, T. F., Sorenson, R. L., y Robertson, R. P. (1995). Morphological and functional characterization of  $\beta$ tc-6 cells—an insulin-secreting cell line derived from transgenic mice. *Diabetes*, 44(3), 306–313.
- Promega. (2018a). *Goscript™ reverse transcription system technical manual*.
- Promega. (2018b). *Sv total rna isolation system protocol*.
- Qian, J., y Scheer, F. A. J. (2016). Circadian system and glucose metabolism: Implications for physiology and disease [Journal Article]. *Trends Endocrinol Metab*, 27(5), 282-293. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27079518> (Qian, Jingyi Scheer, Frank A J L 2016/4/16) doi: 10.1016/j.tem.2016.03.005
- Rakshit, K., Qian, J., Gaonkar, K. S., Dhawan, S., Colwell, C. S., y Matveyenko, A. V. (2018). Postnatal ontogenesis of the islet circadian clock plays a contributory role in  $\beta$ -cell maturation

- process [Journal Article]. *Diabetes*, 67(5), 911-922. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29500314> doi: 10.2337/db17-0850
- Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., y Lin, X. (2013). An improvement of the  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$  method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis [Journal Article]. *Biostat Bioinforma Biomath*, 3(3), 71-85. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25558171>
- Reinehr, T. (2013). Type 2 diabetes mellitus in children and adolescents [Journal Article]. *World J Diabetes*, 4(6), 270-81. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24379917> doi: 10.4239/wjd.v4.i6.270
- Rezania, A., Bruin, J. E., Arora, P., Rubin, A., Batushansky, I., Asadi, A., ... Kieffer, T. J. (2014). Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells [Journal Article]. *Nat Biotechnol*, 32(11), 1121-33. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25211370> doi: 10.1038/nbt.3033
- Rickels, M. R., y Robertson, R. P. (2019). Pancreatic islet transplantation in humans: Recent progress and future directions [Journal Article]. *Endocr Rev*, 40(2), 631-668. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30541144> doi: 10.1210/er.2018-00154
- Rivera-Torres, J. (2015). Analysis of gene and protein expression in atherosclerotic mouse aorta by western blot and quantitative real-time pcr [Journal Article]. *Methods Mol Biol*, 1339, 309-22. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26445798> (Rivera-Torres, José 2015/10/9) doi: 10.1007/978-1-4939-2929-0\_21
- Rossner, M. J., Oster, H., Wichert, S. P., Reinecke, L., Wehr, M. C., Reinecke, J., ... Nave, K. A. (2008). Disturbed clockwork resetting in sharp-1 and sharp-2 single and double mutant mice [Journal Article]. *PLoS One*, 3(7), e2762. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18648504> doi: 10.1371/journal.pone.0002762
- Salinno, C., Cota, P., Bastidas-Ponce, A., Tarquis-Medina, M., Lickert, H., y Bakhti, M. (2019). -cell maturation and identity in health and disease [Journal Article]. *Int J Mol Sci*, 20(21). Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31671683> doi: 10.3390/ijms20215417
- Sam, B. (2016). *Análisis de situación: Enfermedades no transmisibles 2016* [Government Document]. Descargado de <http://epidemiologia.mspas.gob.gt/files/Publicaciones%202017/Enfermedades%20%20No%20Transmisibles%202016.pdf>
- Sam, B. (2019). *Situación epidemiológica de enfermedades no transmisibles en guatemala* [Government Document].
- Sam, B. (2020). *Análisis de situación de enfermedades no transmisibles 2020* [Government Document]. Descargado de <http://epidemiologia.mspas.gob.gt/files/2020/salassituacionales/notransmisibles/analisis-ent-2020.pdf>
- Saxton, R. A., y Sabatini, D. M. (2017). mtor signaling in growth, metabolism, and disease [Journal Article]. *Cell*, 169(2), 361-371. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28388417> doi: 10.1016/j.cell.2017.03.035
- Seshadri, N., y Doucette, C. A. (2021). Circadian regulation of the pancreatic beta cell [Journal Article]. *Endocrinology*, 162(9). Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33914056> doi: 10.1210/endo/bqab089
- Shapiro, A. M., Lakey, J. R., Ryan, E. A., Korbitt, G. S., Toth, E., Warnock, G. L., ... Rajotte, R. V. (2000). Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen [Journal Article]. *N Engl J Med*, 343(4), 230-8. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10911004> doi: 10.1056/NEJM200007273430401
- Sneddon, J. B., Tang, Q., Stock, P., Bluestone, J. A., Roy, S., Desai, T., y Hebrok, M. (2018). Stem cell therapies for treating diabetes: progress and remaining challenges. *Cell stem cell*, 22(6), 810-823.
- Soper, D. (2022). *t-test sample size calculator* [Online Software]. Descargado de <https://www.analyticscalculators.com>
- Spandidos, A., Wang, X., Wang, H., Dragnev, S., Thurber, T., y Seed, B. (2008). A comprehensive collection of experimentally validated primers for polymerase chain reaction quantitation of murine transcript abundance [Journal Article]. *BMC Genomics*, 9, 633. Descargado

- de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19108745> (Spandidos, Athanasia Wang, Xiaowei Wang, Huajun Dragnev, Stefan Thurber, Tara Seed, Brian 2008/12/26) doi: 10.1186/1471-2164-9-633
- Strober, W. (2015). Trypan blue exclusion test of cell viability [Journal Article]. *Curr Protoc Immunol*, 111, A3.B.1-A3.B.3. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26529666> doi: 10.1002/0471142735.ima03bs111
- Takahashi, J. S. (2017). Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock [Journal Article]. *Nat Rev Genet*, 18(3), 164-179. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27990019> doi: 10.1038/nrg.2016.150
- Takahashi, K., y Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors [Journal Article]. *Cell*, 126(4), 663-76. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16904174> doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024
- ThermoFisherScientific. (2011). Power sybr green rt-pcr reagents kit user guide. *Life Technologies*.
- ThermoFisherScientific. (2015). Cell culture basics handbook. *UK: Gibco*.
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., y Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts [Journal Article]. *Science*, 282(5391), 1145-7. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9804556> doi: 10.1126/science.282.5391.1145
- Van Acker, S. I., Van Acker, Z. P., Haagdoorens, M., Pintelon, I., Koppen, C., y Zakaria, N. (2019). Selecting appropriate reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction studies in isolated and cultured ocular surface epithelia [Journal Article]. *Sci Rep*, 9(1), 19631. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31873107> doi: 10.1038/s41598-019-56054-1
- Velazco-Cruz, L., Goedegebuure, M. M., y Millman, J. R. (2020). Advances toward engineering functionally mature human pluripotent stem cell-derived  $\beta$ cells [Journal Article]. *Front Bioeng Biotechnol*, 8, 786. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32733873> doi: 10.3389/fbioe.2020.00786
- Warshauer, J. T., Bluestone, J. A., y Anderson, M. S. (2020). New frontiers in the treatment of type 1 diabetes [Journal Article]. *Cell Metab*, 31(1), 46-61. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31839487> doi: 10.1016/j.cmet.2019.11.017
- (WHO), W. H. O. (2016). *Global report on diabetes: executive summary* (Inf. Téc.). World Health Organization.
- Wickham, H., Chang, W., y Wickham, M. H. (2016). Package ‘ggplot2’. *Create Elegant Data Visualisations Using the Grammar of Graphics. Version*, 2(1), 1-189.
- Zhang, E. E., y Kay, S. A. (2010). Clocks not winding down: unravelling circadian networks [Journal Article]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(11), 764-76. Descargado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20966970> (Zhang, Eric E Kay, Steve A 2010/10/23) doi: 10.1038/nrm2995

---

Lista de figuras de anexos

---

1.	Gráfica de barras a escala log <sub>2</sub> de la expresión relativa en las réplicas del tratamiento glucosa transitoria 5 mM /5 mM. . . . .	53
2.	Gráfica de barras a escala log <sub>2</sub> de la expresión relativa en las réplicas del tratamiento glucosa transitoria 8 mM /20 mM. . . . .	54

---

Lista de cuadros de anexos

---

1. Número de células, viabilidad y días de cultivo para cada pasaje. . . . .	50
2. Concentración de ARN extraído durante las tres semanas experimentales. . . . .	50
3. Resultados de la prueba de normalidad Shapiro-Wilk para cada uno de los tratamientos. . . . .	51
4. Resultados de la prueba de Levene de homocedasticidad para cada uno de los tratamientos. . . . .	51
5. Resultados de la prueba T de Welch (two-sided) para cada uno de los genes de interés y los tratamientos estables en comparación al control glucosa estable 5 Mm. . . . .	52
6. Resultados de la prueba T de Welch (two-sided) para cada uno de los genes de interés y los tratamientos transitorios en comparación al control glucosa estable 5 mM. . . . .	52

Cuadro 1: Número de células, viabilidad y días de cultivo para cada pasaje.

Número de Pasaje	Flask	Número de células sembradas	Número de días de cultivo	Número total de células	Viabilidad
4	Envío 1	6 Millones	8 días	25.6 Millones	86.41 %
4	Envío 2	6 Millones	11 días	23.8 Millones	80.76 %
5	Mantenimiento	5 Millones	7 días	14.8 Millones	74.18 %
5	Criopreservación	5 Millones	10 días	21.6 Millones	86.29 %
6	Mantenimiento	5 Millones	8 días	21.7 Millones	88.38 %
6	Criopreservación	5 Millones	8 días	20.0 Millones	87.46 %
7	Mantenimiento	5 Millones	7 días	19.7 Millones	88.28 %
7	Criopreservación	5 Millones	7 días	20.4 Millones	86.23 %
8	Mantenimiento	8 Millones	7 días	24.1 Millones	91.16 %
8	Criopreservación	8 Millones	7 días	26.7 Millones	86.12 %

Cuadro 2: Concentración de ARN extraído durante las tres semanas experimentales.

Tratamiento	ng/uL	A260/A280
Glucosa 20 mM estable	24.2 ± 0.3	2.0 ± 0.03
	80.0 ± 0.1	2.1 ± 0.01
	86.8	2.1 ± 0.01
Glucosa 8 mM estable	13.9 ± 0.4	2.0 ± 0.01
	121.5 ± 0.4	2.1
	90.6 ± 0.7	2.1 ± 0.01
Glucosa 5 estable	31.0 ± 0.2	2.0 ± 0.01
	116.5 ± 0.4	2.1 ± 0.01
	121.9 ± 0.3	2.1
Glucosa 5 mM /5 mM Transitorio	30.3 ± 0.4	2.0 ± 0.01
	136.6 ± 0.6	2.1 ± 0.01
	69.9 ± 1.1	2.1 ± 0.01
Glucosa 8 y 20 mM transitorio	12.6 ± 0.5	2.1 ± 0.07
	54.5 ± 0.3	2.1 ± 0.01
	83.2 ± 0.5	2.1 ± 0.01

La extracción se realizó mediante el kit Promega y su concentración y pureza A260/280 fue medida en el nanodrop en duplicado para cada uno de los tratamientos evaluados.

Cuadro 3: Resultados de la prueba de normalidad Shapiro-Wilk para cada uno de los tratamientos.

Gen	Valor p			
	Glucosa 20 Mm estable	Glucosa 8 Mm estable	Glucosa 5 mM /5 Mm transitorio	Glucosa 8 mM /20 Mm transitorio
Arntl	0.29	0.34	0.20	0.12
Dec1	0.49	0.34	0.03*	0.55
Myc	0.36	0.51	0.59	0.31
Nr1d1	0.04*	0.94	0.17	0.18
Per1	0.92	0.60	0.86	0.41

Los resultados fueron determinados por medio del paquete rstatix de R para evaluar normalidad de las muestras donde la hipótesis alternativa plantea que los datos evaluados no presentan la misma distribución que una distribución normal, la cual se rechaza si el valor  $p > 0.05$ .

Cuadro 4: Resultados de la prueba de Levene de homocedasticidad para cada uno de los tratamientos.

Tratamiento	Gen	Valor p
<b>Glucosa 20 mM estable</b>	18s	0.73
	Arntl	0.01**
	Dec1	0.01*
	Nr1d1	0.08
	Myc	0.02*
	Per1	0.002**
<b>Glucosa 8 mM estable</b>	18s	0.23
	Arntl	0.03*
	Dec1	0.03*
	Nr1d1	0.01**
	Myc	0.01**
	Per1	0.03*
<b>Glucosa 5 mM /5 mM transitorio</b>	18s	0.86
	Arntl	0.14
	Dec1	0.10
	Nr1d1	0.02*
	Myc	0.003***
	Per1	0.04*
<b>Glucosa 8 mM /20 mM transitorio</b>	18s	0.19
	Arntl	0.06
	Dec1	0.02*
	Nr1d1	0.02*
	Myc	0.04*
	Per1	0.0002***

Los resultados fueron determinados por medio del paquete rstatix de R para evaluar homocedasticidad de las muestras donde la hipótesis alternativa plantea que los datos evaluados no tienen una varianza constante, por lo que esta no puede rechazarse si el valor  $p < 0.05$ . Donde \* muestra el grado de significancia siendo (\*) menor a (\*\*\*)

Cuadro 5: Resultados de la prueba T de Welch (two-sided) para cada uno de los genes de interés y los tratamientos estables en comparación al control glucosa estable 5 Mm.

Gen	Variable 1	Variable 2	Valor p
<b>Glucosa 20 mM estable</b>			
Arntl			0.07
18s			0.70
Dec1	Glucosa 5 mM estable	Glucosa 20 mM estable	0.84
Myc			0.31
Nr1d1			0.27
Per1			0.13
<b>Glucosa 8 mM estable</b>			
Arntl			0.54
18s			0.26
Dec1	Glucosa 5 mM estable	Glucosa 8 mM estable	0.31
Myc			0.71
Nr1d1			0.67
Per1			0.78

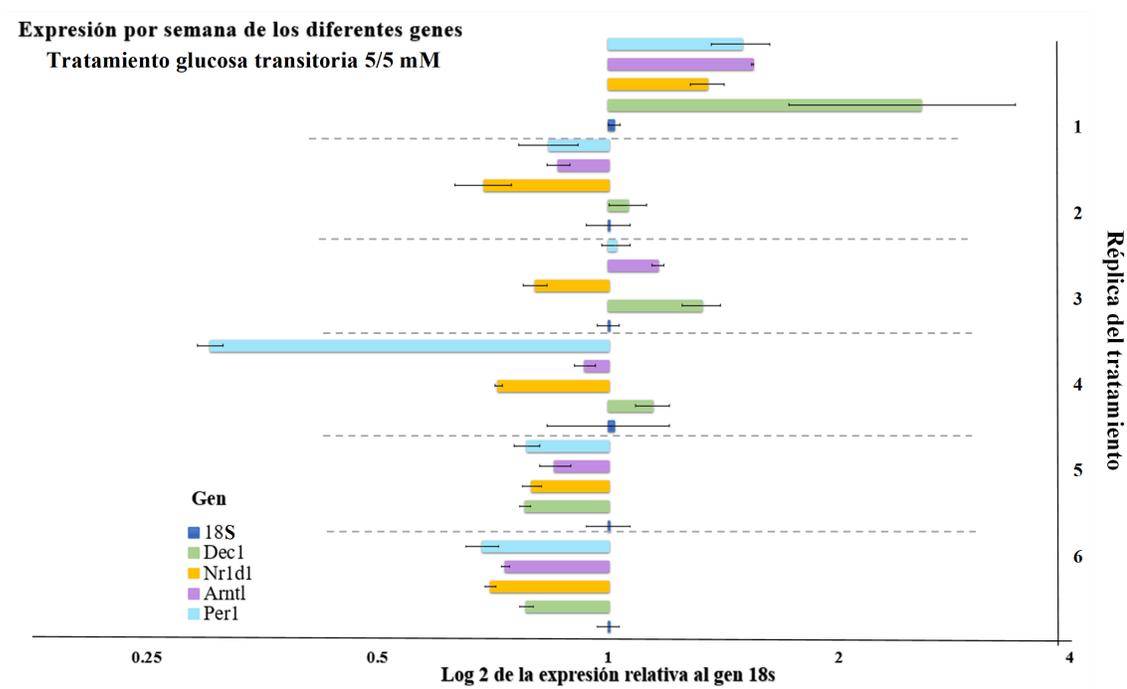
Los resultados fueron determinados por medio del paquete rstatix de R para evaluar si existe una diferencia significativa entre los promedios de cada gen entre los tratamientos de glucosa estable 20 mM y 8 mM contra el tratamiento de glucosa 5 mM estable donde la hipótesis alternativa plantea que los promedios no son iguales, la cual no puede rechazarse si el valor  $p < 0.05$ .

Cuadro 6: Resultados de la prueba T de Welch (two-sided) para cada uno de los genes de interés y los tratamientos transitorios en comparación al control glucosa estable 5 mM.

Gen	Variable 1	Variable 2	Valor p
<b>Glucosa 5 mM /5 mM transitorio</b>			
Arntl			0.94
18s			0.47
Dec1	Glucosa 5 mM estable	Glucosa 5 mM /5 mM transitorio	0.33
Myc			0.16
Nr1d1			0.0004**
Per1			0.40
<b>Glucosa 8 mM /20 mM transitorio</b>			
Arntl			0.56
18s			0.20
Dec1	Glucosa 5 mM estable	Glucosa 8 mM /20 mM transitorio	0.64
Myc			0.40
Nr1d1			0.52
Per1			0.72

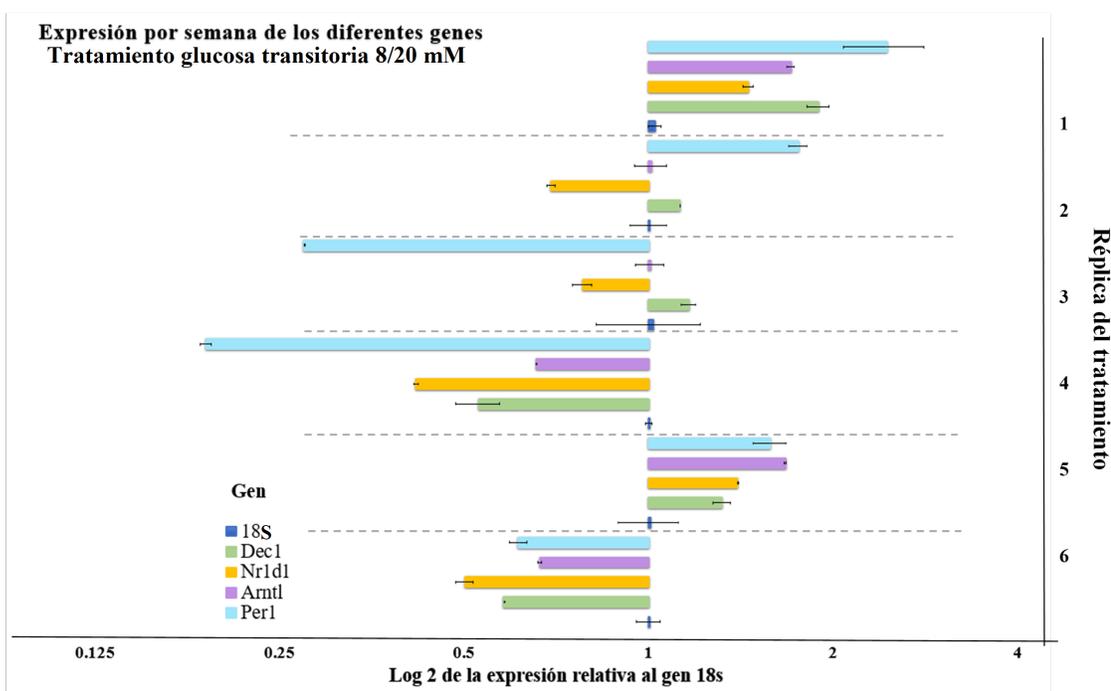
Los resultados fueron determinados por medio del paquete rstatix de R para evaluar si existe una diferencia significativa entre los promedios de cada gen entre los tratamientos de glucosa transitorios de 5 mM /5mM y 8 mM /20 mM contra el tratamiento de glucosa 5 mM estable donde la hipótesis alternativa plantea que los promedios no son iguales, la cual no puede rechazarse si el valor  $p < 0.05$ . (\*\*) nivel de significancia.

Figura 1: Gráfica de barras a escala log2 de la expresión relativa en las réplicas del tratamiento glucosa transitoria 5 mM /5 mM.



Aquí se observa la expresión relativa de cada una de las réplicas biológicas ( $n = 2$ ) del tratamiento de glucosa transitoria 5 mM /5 mM dentro de cada uno de experimentos independientes realizados ( $N=3$ ) a una escala log2.

Figura 2: Gráfica de barras a escala log2 de la expresión relativa en las réplicas del tratamiento glucosa transitoria 8 mM /20 mM.



Aquí se observa la expresión relativa de cada una de las réplicas biológicas (n = 2) del tratamiento de glucosatransitoria 8 mM /20 mM dentro de cada uno de experimentos independientes realizados (N=3) a una escala log2.