

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS	8
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	9
RESUMEN.....	10
INTRODUCCION	11
HIPÓTESIS.....	15
OBJETIVOS	15
1. Objetivo general.....	15
2. Objetivos específicos	15
MATERIALES Y MÉTODOS	16
1. EXTRACTO DE ALPERUJO.....	16
2. CÉLULAS β PANCREÁTICAS MIN-6.....	16
3. ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR MIN-6	17
3.1 Viabilidad celular frente a glucosa.....	18
3.2 Viabilidad celular frente a H ₂ O ₂	19
3.3 Viabilidad celular frente al extracto de alperujo	20
4 ENSAYOS CELULARES.....	20
5 MEDICIÓN DE INSULINA	21
5.1 Extracción de insulina	21
5.2 Cuantificación de insulina	22
6 MEDICIÓN DE PROTEÍNAS EN LISADO CELULAR.....	22
6.1 Extracción de proteínas	22
6.2 Cuantificación de proteínas	23
7 OBTENCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE RNA.....	23
7.1 Extracción de RNA	23
7.2 Cuantificación de RNA extraído	24
7.3 Digestión de DNA contaminante	24
7.4 Obtención de cDNA	25
7.5 Reacción en cadena de la Polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR)	25

8	ESPECIES REACTIVAS DEL OXIGENO (ROS).....	27
9	HIERRO INTRACELULAR.....	27
10	ENSAYO DE CAPTACIÓN DE GLUCOSA- ³ H	28
11	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	29
	RESULTADOS.....	30
1.	Viabilidad celular MIN-6 desafiadas con diferentes concentraciones de glucosa, H ₂ O ₂ y EA.....	30
1.1.	Viabilidad celular en células MIN-6 desafiadas con H ₂ O ₂	30
1.2.	Viabilidad celular en células MIN-6 desafiadas con glucosa	31
1.3.	Viabilidad celular en células MIN-6 desafiadas con EA	31
2.	Generación de ROS y concentración de hierro intracelular en células MIN-6 desafiadas con glucosa y H ₂ O ₂ en presencia o ausencia de EA.....	32
2.1.	Generación de ROS.....	32
2.2.	Concentración de hierro intracelular.....	33
3.	Secreción de insulina y captación de glucosa- ³ H en células MIN-6 desafiadas con glucosa y H ₂ O ₂ en presencia o ausencia de EA.	35
3.1.	Secreción de insulina.....	35
3.2.	Captación de glucosa- ³ H.....	37
4.	Expresión génica de UCP-2, Tiorredoxina, p47 ^{phox} y relación Bax/Bcl-2 en células MIN-6 desafiadas con glucosa y H ₂ O ₂ en presencia o ausencia de EA.....	38
4.1.	UCP-2.....	38
4.2.	Tiorredoxina (TRDX)	39
4.3.	p47 ^{phox}	41
4.4.	Relación Bax/Bcl-2	43
	DISCUSIÓN	45
	CONCLUSIÓN.....	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Protocolo para la preparación de 1 mL de Medios de Cultivos con distintas concentraciones de glucosa.	19
Tabla 2	Protocolo para la preparación de 1 mL de Medios de Cultivos con distintas concentraciones de H ₂ O ₂ .	19
Tabla 3	Protocolo para la preparación de 1 mL de Medios de Cultivos con distintas concentraciones de fenoles totales o equivalentes de ácido gálico del EA.	20
Tabla 4	Condiciones de cultivo a las que fueron sometidas las células MIN-6.	21

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1	Porcentaje de viabilidad celular MIN-6 frente a concentraciones crecientes de H ₂ O ₂ .	30
Figura 2	Porcentaje de viabilidad celular MIN-6 frente a concentraciones crecientes de glucosa.	31
Figura 3	Porcentaje de viabilidad celular MIN-6 frente a concentraciones crecientes de equivalentes de ácido gálico o fenoles totales presentes en el EA.	32
Figura 4	Emisión de fluorescencia por generación de ROS en células MIN-6 sometidas a diferentes condiciones de tratamiento con estresores y EA.	33
Figura 5	Concentración de hierro intracelular por mg de proteína en células MIN-6 sometidas a diferentes condiciones de tratamiento con estresores y EA.	35
Figura 6	Concentración de insulina liberada por µg de proteína en células MIN-6 sometidas a diferentes condiciones de tratamiento con estresores y EA.	36
Figura 7	Veces de cambio con respecto al control, en la concentración de glucosa- ³ H (mM) captada por mg de proteína en células MIN-6 sometidas a diferentes condiciones de tratamiento con estresores y EA.	37
Figura 8	Veces de cambio con respecto al control, en la abundancia relativa del RNAm de UCP-2 en células MIN-6 sometidas a diferentes condiciones de tratamiento con estresores y EA.	39
Figura 9	Veces de cambio con respecto al control, en la abundancia relativa del RNAm de TRDX en células MIN-6 sometidas a diferentes condiciones de tratamiento con estresores y EA.	41
Figura 10	Veces de cambio, con respecto al control, en la abundancia relativa del RNAm de p47 ^{phox} en células MIN-6 sometidas a diferentes condiciones de tratamiento con estresores y EA.	42
Figura 11	Relación Bax/Bcl-2 en células MIN-6 sometidas a diferentes condiciones de tratamiento con estresores y EA.	44