

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 |