



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica
i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio
Natural

Grado en Biotecnología

Caracterización del modelo de ratón *knock-in* IRS2-GFP-Luc

TRABAJO FIN DE GRADO

Curso académico 2020-2021

Autora: Carla Belda Silvestre

Tutora: Dra. Deborah Jane Burks

Cotutora: Dra. Esperanza Irlés Vidal

Tutor académico: Dr. Ismael Rodrigo Bravo

Valencia, julio 2021

Caracterización del modelo de ratón *knock-in* IRS2-GFP-Luc

Resumen

El sustrato del receptor de la insulina 2 (IRS2) es una proteína adaptadora citoplasmática esencial en las vías de señalización celular reguladas por el receptor de la insulina, el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina y sus ligandos. Los ratones con deficiencia de IRS2 muestran un crecimiento cerebral alterado, subfertilidad y desarrollan progresivamente diabetes debido a una reducción de la masa de las células beta pancreáticas y al desarrollo de resistencia periférica a la insulina. Sin embargo, pese a ser esencial para el crecimiento y la función de los islotes, los niveles de expresión de IRS2 en el páncreas endocrino son relativamente bajos. Ello, sumado a la falta de herramientas adecuadas, ha dificultado históricamente el estudio de IRS2 en el páncreas endocrino en diferentes etapas del desarrollo o en condiciones patológicas. En este contexto, el grupo de la Dra. Burks ha generado un nuevo modelo murino reportero que permite monitorizar la expresión génica endógena *in vivo* e *in vitro*. El objetivo general del presente TFG era explorar varias técnicas para caracterizar la expresión de IRS2 en dicho modelo reportero de ratón. Empleando *western blot* se evaluó la expresión de IRS2 en los islotes pancreáticos y en el bazo mediante la detección de las proteínas reporteras GFP (*Green Fluorescent Protein*) y luciferasa. La expresión de IRS2 aumenta con la edad tanto en los islotes como en el bazo en el modelo reportero. Mediante citometría de flujo se observó que las células del páncreas que no expresan GFP/IRS2 son más proliferativas que las que sí expresan GFP/IRS2. Además, se han comenzado a establecer las condiciones técnicas óptimas para separar las células de los islotes GFP+ y GFP- del modelo reportero mediante citometría de tipo FACS, a la espera de confirmar si la estrategia de *sorting* utilizada es adecuada o no.

Palabras clave: IRS2; diabetes; islotes pancreáticos; GFP; luciferasa; bazo

Autora: Carla Belda Silvestre

Tutora: Dra. Deborah Jane Burks

Cotutora: Dra. Esperanza Irlés Vidal

Tutor académico: Dr. Ismael Rodrigo Bravo

Valencia, julio de 2021

Characterization of the IRS2-GFP-Luc knock-in mouse model

Abstract

Insulin Receptor Substrate 2 (IRS2) is a cytoplasmic adaptor protein essential in cell signalling pathways governed by the insulin receptor, insulin-like growth factor receptor and their ligands. IRS2-deficient mice show impaired brain growth, subfertility, and progressively develop diabetes due to a reduction in pancreatic beta-cell mass and the development of peripheral insulin resistance. However, despite being essential for islet growth and function, IRS2 expression levels in the endocrine pancreas are relatively low and the lack of appropriate tools has historically hindered the study of IRS2 in the endocrine pancreas at different developmental stages or in pathological conditions. In this context, the group of Dr. Burks has generated a new murine reporter model allowing endogenous gene expression to be monitored *in vivo* and *in vitro*. The overall objective of the current TFG was to explore various techniques to characterize IRS2 expression in this mouse reporter model. Using western blot, IRS2 expression in pancreatic islets and spleen was assessed by detecting the GFP (Green Fluorescent Protein) and luciferase reporter proteins. IRS2 expression increases with age in both islets and spleen in the reporter model. Using flow cytometry, we observed that pancreas cells that do not express GFP/IRS2 are more proliferative than those that do express GFP/IRS2. We have also begun to establish the optimal technical conditions for separating GFP+ and GFP- islet cells from the reporter model by FACS-type cytometry, pending confirmation of whether the sorting strategy used is appropriate or not.

Key words: IRS2; diabetes; pancreatic islets; GFP; luciferase; spleen

Author: Carla Belda Silvestre

Tutor: Dr. Deborah Jane Burks

Cotutor: Dr. Esperanza Irlles Vidal

Academic tutor: Dr. Ismael Rodrigo Bravo

Valencia, July 2021

Agradecimientos y dedicatorias

En primer lugar, quiero darle las gracias a Deborah por haberme brindado la oportunidad de trabajar en el laboratorio durante estos meses. Por supuesto, quiero agradecerle a Esperanza todo el tiempo y esfuerzo que me ha dedicado. También a Arantxa, Carlos, Amparo, M.J. y María por haberme ayudado siempre que lo he necesitado. No me olvido de Ismael, que ha estado ahí cuando ha hecho falta para encontrar una solución a todo.

Sin todos vosotros este trabajo no podría haberse realizado, así que muchísimas gracias.

Les agradezco de corazón también a Silvia, Jaime, Edu, María, Guillem, Elia y Alicia el haberme apoyado en los momentos difíciles de esta temporada. Vuestro cariño ha sido clave para sacar adelante el trabajo.

Índice temático

1. Introducción	1
1.1 La diabetes. Tipos y prevalencia	1
1.1.1 Diabetes mellitus tipo 2.....	2
1.2 El páncreas endocrino	3
1.2.1 Los islotes de Langerhans	3
1.2.2 El páncreas endocrino en la condición diabética.....	5
1.3 Sustratos del receptor de insulina.....	6
1.3.1 IRS2.....	8
1.4 El modelo reportero <i>knock-in IRS2/Luciferasa/GFP</i>	9
1.4.1 Expresión de IRS2 en el bazo	10
2. Objetivos	13
3. Materiales y Métodos	14
3.1 Animales	14
3.2 Aislamiento de tejidos.....	14
3.3 Citometría de flujo y FACS	14
3.4 Extracción de proteína.....	15
3.5 <i>Western blot</i>	15
3.5.1 Preparación de muestras y geles de poliacrilamida.....	16
3.5.2 Electroforesis y transferencia húmeda	16
3.5.3 Bloqueo y detección de GFP, luciferasa y beta-actina.....	17
3.6 Análisis estadístico.....	17
4. Resultados y discusión	18
4.1 Detección de GFP en islotes mediante <i>western blot</i> : la expresión de GFP aumenta con la edad.	18
4.2 Análisis de la proliferación en células GFP+ y GFP- de islotes mediante citometría de flujo: las células GFP+ proliferan menos que las células GFP-.....	19
4.3 Detección de GFP en células de islote y separación celular mediante FACS (<i>fluorescence-activated cell sorting</i>) : puesta a punto de la técnica.....	21
4.4 Detección de GFP y luciferasa en bazo mediante <i>western blot</i> : la expresión de ambas proteínas reporteras aumenta con la edad.....	21
5. Conclusiones	23
6. Referencias bibliográficas	24

Índice de figuras

Figura 1. Histología del páncreas de ratón (<i>Mus musculus</i>).....	4
Figura 2. Imágenes del marcaje inmunofluorescente de islotes de Langerhans ilustrativas de las diferencias interespecie en la disposición de los tipos de células endocrinas	5
Figura 3. Representación de la evolución de las células beta desde el estado prediabético, caracterizado por una resistencia periférica a la insulina, hasta la condición de diabetes tipo 2, vinculada a la intolerancia a la glucosa.....	6
Figura 4. Esquema de los dominios estructurales de la familia proteica IRS (sustratos del receptor de insulina	8
Figura 5. Esquema de las bases genéticas del modelo murino reportero <i>IRS2/luciferasa/GFP</i> ..	10
Figura 6. Imágenes de bioluminiscencia de luciferasa para la caracterización de la expresión de <i>IRS2</i> (sustrato del receptor de insulina de tipo 2) en tejidos inmunes aislados.....	11
Figura 7. Histología del bazo de rata (<i>Rattus norvegicus</i>)	12
Figura 8. <i>Western blot</i> de proteína de islotes de ratones hembra <i>knock-in</i> de 2, 12 y 18 meses. 18	
Figura 9. Análisis de la proliferación celular en células de islotes GFP+ y GFP- mediante citometría de flujo en ratones <i>wild-type</i> y <i>knock-in</i>	19
Figura 10. Representación gráfica de la proliferación celular en células de islotes <i>wild-type</i> (WT) y <i>knock-in</i> (KI) correspondiente a los datos de la Figura 9.....	20
Figura 11. Estrategia de <i>sorting</i> establecida para la separación de poblaciones GFP+ y GFP- en islotes de ratón <i>knock-in</i>	21
Figura 12. <i>Western blot</i> de proteína de bazo de ratones hembra <i>knock-in</i> de 2, 12 y 18 meses..	22

Índice de tablas

Tabla 1. Composición de la parte separadora y concentradora de los geles de poliacrilamida empleados en el <i>western blot</i>	16
--	----

Listado de abreviaturas

ATP: adenosín trifosfato

BCA: ácido bicinconínico

BSA: *Bovine Serum Albumin*, albúmina de suero bovino

Cdk4: *Cyclin dependent kinase 4*, quinasa dependiente de ciclina 4

DM1: Diabetes mellitus tipo 1

DM2: Diabetes mellitus tipo 2

DMG: Diabetes mellitus gestacional

EDTA: ácido etilendiaminatetraacético

eGFP: *enhanced Green Fluorescent Protein*

FACS: *Fluorescence-Activated Cell Sorting*, Separador de Células Activado por Fluorescencia

FBS: *Fetal Bovine Serum*, suero fetal bovino

GFP: *Green Fluorescent Protein*, proteína verde fluorescente

GFP+: que expresa GFP

GFP-: que no expresa GFP

Grb2: *Growth factor receptor-bound protein 2*

HEPES: ácido 4-(2-hidroxiethyl)piperazin-1-iletanosulfónico

HRP: *Horseradish peroxidase*, peroxidasa de rábano

IGF-1: *Insulin-like Growth Factor-1*, factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1

IGF-1R: *Insulin-like Growth Factor-1 Receptor*, receptor del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1

IRES: *Internal Ribosome Entry Site*, sitio interno de entrada al ribosoma

IRS: *Insulin Receptor Substrates*, sustrato del receptor de insulina

IRS1: *Insulin Receptor Substrate 1*, sustrato del receptor de insulina 1

IRS1^{-/-}: carente del gen *IRS1* o *knock-out* para el gen *IRS1*

IRS2: *Insulin Receptor Substrate 2*, sustrato del receptor de insulina 2

IRS2^{-/-}: carente del gen *IRS2* o *knock-out* para el gen *IRS2*

KI: *knock-in*

KRLB: *Kinase Regulatory Loop Binding*

Luc: luciferasa

MAPK: *Mitogen-Activated Protein Kinase*, proteína quinasa activada por mitógenos

mTOR: *mechanistic target of rapamycin*

NAOS: Nutrición, Actividad Física y Prevención de la Obesidad

NPXY: Asparagina-Prolina-cualquier aminoácido-Tirosina

PALS: *periarterial lymphatic sheaths*, envuelta periarterial linfoide

PBS: *Phosphate-Buffered Saline*, tampón fosfato salino

PDK: *phosphoinositide-dependent protein kinase*, quinasa dependiente de fosfoinositol

PDVF: *polyvinylidene difluoride*, fluoruro de polivinilideno

PH: *Pleckstrin homology*

PI3,4P₂: fosfatidilinositol-3,4-bisfosfato

PI3,4,5P₂: fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato

PI3K: *phosphatidylinositol 3-kinase*, fosfoinositol 3-quinasa

PKC: *protein kinase C*, proteína quinasa C

poli-A: poli-adenina

PTB: *phosphotyrosine binding*

SH2: *Src homology region 2*

SHP2: *Src homology region 2-containing protein tyrosine phosphatase 2*

SDS: *Sodium Dodecyl Sulfate*, dodecilsulfato sódico

SDS-PAGE: *Sodium Dodecyl Sulfate Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis*

SOX-9: *SRY-box transcription factor 9*

TBS: *Tris-Buffered Saline*

TBS-T: *Tris-Buffered Saline- Tween 20*

TEMED: tetrametiletilendiamina

WT: *wild-type*

1. Introducción

1.1 La diabetes. Tipos y prevalencia

La diabetes mellitus engloba un conjunto de trastornos metabólicos cuyo rasgo definitorio es la hiperglucemia. Constituye un síndrome en el que dichos trastornos conllevan una sintomatología y complicaciones similares, si bien presentan etiologías diferentes. En este sentido, atendiendo a la etiología, pueden definirse las dos formas más comunes de diabetes mellitus: la diabetes mellitus tipo 1 (DM1), producida como resultado de una destrucción de las células beta pancreáticas y una consiguiente deficiencia de insulina; y la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), causada por una pérdida progresiva de la funcionalidad secretora de dichas células asociada a una resistencia periférica a la acción de la insulina. En ambos casos, la funcionalidad deficiente de las células beta pancreáticas desencadena hiperglucemia crónica, así como un metabolismo desregulado (Guthrie, R. y Guthrie D., 2004; Schmidt, 2018).

La hiperglucemia crónica, cuyos síntomas asociados son la poliuria, polidipsia, pérdida de peso e incluso la polifagia, se asocia a daños a largo plazo, especialmente en los nervios y vasos sanguíneos, y a disfunciones orgánicas que pueden conducir a complicaciones severas como la ceguera, enfermedades cardiovasculares, fallos renales y amputaciones (Schmidt, 2018; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2011; ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD [OMS], 2021). De hecho, todos los tipos de diabetes pueden ocasionar complicaciones y aumentar el riesgo general de muerte prematura (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD [OMS], 2016, p. 2). Existe un tercer tipo de diabetes mellitus, la diabetes mellitus gestacional (DMG), la cual puede surgir durante el embarazo, constituyendo el desorden metabólico más común de la gestación (Chiefari *et al.*, 2017). Se define como la diabetes diagnosticada durante el embarazo que no es claramente una diabetes manifiesta (Coustan, 2013), y tiene su origen en las alteraciones metabólicas que se dan durante este periodo, entre las cuales destaca una condición de resistencia periférica a la insulina (Chiefari *et al.*, 2017).

La diabetes constituye una de las cuatro principales enfermedades no transmisibles, junto con el cáncer, las enfermedades respiratorias crónicas y las enfermedades cardiovasculares (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD [OMS], 2021). Además, dado que la hiperglucemia se desarrolla gradualmente y no se manifiesta sintomatología en estadios tempranos, es frecuente que no se diagnostique la DM2 durante años (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2011). A nivel mundial, la prevalencia de la diabetes en personas mayores de 18 años se ha visto incrementada en un 3,8 % desde 1980 hasta 2014, siendo la prevalencia en cada uno de estos años de 4,7 % y 8,5 %, respectivamente. Por su parte, en Europa, existen actualmente alrededor de 60 millones de pacientes de diabetes, constituyendo el 10,3 % de los hombres y el 9,6 % de las mujeres mayores de 25 años. Además, con el aumento del sobrepeso, las dietas poco saludables y el sedentarismo, la prevalencia de la DM2 está incrementándose a una velocidad vertiginosa en países desarrollados, incluyendo España (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). No obstante, en la última década, la prevalencia de esta enfermedad ha aumentado a mayor velocidad en los países de recursos escasos que en los de ingresos altos (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD [OMS], 2016, p. 2). Según un estudio realizado en 2020, en nuestro país existe una incidencia de diabetes, ajustada por edad, sexo y forma de

detección, de 11,6 casos/1.000 personas-año, lo cual se traduce en la aparición de 386.000 nuevos casos de DM2 en la población española adulta cada año (Rojo-Martínez *et al.*, 2020).

A raíz de la tendencia anteriormente descrita hacia un mayor sobrepeso, sedentarismo y dietas poco saludables, se ha implementado la estrategia NAOS (Nutrición, Actividad Física y Prevención de la Obesidad). Dado que se basa en el abordaje de dichos tres pilares, los cuales constituyen factores de riesgo para el desarrollo de la DM2, el plan NAOS podría contribuir a reducir los casos de diabetes (AGENCIA ESPAÑOLA DE SEGURIDAD ALIMENTARIA Y NUTRICIÓN [AESAN], 2020).

1.1.1 Diabetes mellitus tipo 2

La DM2 resulta de un fallo progresivo de las células beta del páncreas en un contexto de resistencia periférica a la insulina. Pese a que la resistencia a dicha hormona ha sido considerada el rasgo distintivo de la DM2, el desarrollo de la enfermedad depende de la capacidad de las células beta pancreáticas de satisfacer la mayor demanda de insulina derivada de la resistencia a la misma. De hecho, el fallo de las células beta en el desempeño de esta función ha sido descrito como el principal determinante de que un individuo resistente a la insulina evolucione a ser diabético (Sachdeva y Stoffers, 2009). Así pues, el desarrollo de hiperglucemia manifiesta es generalmente precedido por una disminución de la sensibilidad a la insulina, que a su vez tiene una mayor probabilidad de aparición en escenarios como la obesidad, la edad avanzada y la inactividad física (National Diabetes Information Clearinghouse, 2008, p. 2).

Concretamente, la resistencia a la insulina se define como “la incapacidad de una cantidad conocida de insulina exógena o endógena para aumentar la captación y utilización de la glucosa en un individuo en la misma medida en que lo hace en una población normal” (Lebovitz, 2001). Se han sugerido diversos mecanismos como posibles causas del desarrollo de la resistencia a la acción de la insulina. Algunos de estos incluyen alteraciones genéticas de las proteínas que intervienen en las cascadas de señalización que median la acción intracelular de dicha hormona cuando esta se une al receptor de insulina en la membrana celular (Lebovitz, 2001).

La resistencia a la insulina conduce a una compensación basada en una secreción incrementada de insulina por parte de las células beta pancreáticas. Dicha compensación se produce gracias a que en estas células acontecen dos fenómenos: una capacidad aumentada de secreción de insulina y una expansión de la masa celular (Sachdeva y Stoffers, 2009). En este sentido, en diversos modelos murinos se ha constatado que la hiperplasia de los islotes y la hiperinsulinemia pueden mantener una homeostasis normal de la glucosa en condiciones de resistencia extrema a la insulina (Burks y White, 2001). Por ejemplo, estudios basados en ratas han demostrado que la masa de las células beta, así como la secreción de insulina incrementan adaptativamente con la disminución de la sensibilidad a la insulina vinculada a la edad (Sachdeva y Stoffers, 2009). Del mismo modo, la mayoría de las personas que desarrollan resistencia a la insulina en un contexto como la obesidad no manifiestan hiperglucemia durante un tiempo debido a que la hiperinsulinemia compensa la acción atenuada de la hormona en los tejidos periféricos. Cuando la compensación es inadecuada o la función de las células beta se deteriora, la diabetes emerge (Burks y White, 2001).

En definitiva, la plasticidad de las células beta pancreáticas resulta clave en el estado previo a la DM2. No obstante, cuando el páncreas endocrino alcanza una condición de agotamiento

funcional y, por consiguiente, las células beta pancreáticas no logran compensar la resistencia periférica, se manifiesta la hiperglucemia y, con ella, la diabetes. De hecho, en la DM2 la función de las células beta disminuye linealmente con el tiempo, de modo que, transcurridos 10 años, más de la mitad de los pacientes requieren de terapia basada en administración de insulina exógena (Lim *et al.*, 2011). Asimismo, los pacientes con DM2 presentan una reducción significativa del tamaño de los islotes debido a un aumento de apoptosis de las células beta, relacionando así la disminución de la masa de estas células con el inicio de la enfermedad manifiesta (Sachdeva y Stoffers, 2009). En línea con el desarrollo de la enfermedad, la resistencia no compensada a la acción de la insulina conlleva anomalías en la captación de glucosa, alteraciones en el metabolismo de carbohidratos y lípidos, así como una secreción anormal de la hormona (Burks y White, 2001).

La resistencia a la insulina puede mejorar si se produce una pérdida de peso del paciente, si bien rara vez se consigue restablecer el estado fisiológico normal. Además, los niveles de glucosa en sangre anormalmente altos en estos pacientes reducen su calidad de vida y aumentan su riesgo de padecer diferentes patologías vasculares, visuales y neuronales a largo plazo (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2011). Por tanto, y en vista de los resultados subóptimos de las terapias actuales de la DM2 basadas en restaurar los niveles de insulina mediante la administración de la misma, los estudios orientados a definir nuevas dianas terapéuticas se centran en prevenir la pérdida de las células beta pancreáticas o en estimular su expansión.

1.2 El páncreas endocrino

El páncreas del ratón, a diferencia del humano, no es un órgano bien definido, sino que se encuentra distribuido de forma difusa dentro del mesenterio del intestino delgado proximal. A nivel macroscópico, se encuentra dividido en 3 partes principales: el lóbulo duodenal, el esplénico y el gástrico. Dichos lóbulos se encuentran separados normalmente por zonas de tejido adiposo, conectivo y linfático, de manera que durante la extracción del páncreas se debe prestar especial atención para retirarlo íntegramente (Dolenšek *et al.*, 2015). Este órgano desempeña un papel fundamental en la digestión y absorción de nutrientes, y en la utilización y almacenamiento de sustratos energéticos.

El páncreas está conformado por dos sistemas glandulares diferentes a nivel estructural pero funcionalmente integrados, conocidos como el páncreas exocrino y el páncreas endocrino (Leung, 2010a). A diferencia del endocrino, el páncreas exocrino presenta como función principal la secreción de enzimas digestivas responsables de la digestión y absorción normales de los alimentos, así como de la asimilación de los nutrientes en el organismo (Leung, 2010b). Por su parte, el páncreas endocrino está integrado por cinco tipos de células secretoras agrupadas en los llamados islotes de Langerhans. Dichos islotes constituyen micro-órganos complejos que, en respuesta a cambios en los niveles plasmáticos de nutrientes, producen y liberan diferentes hormonas peptídicas para el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa (In't Veld y Marichal, 2010).

1.2.1 Los islotes de Langerhans

Los islotes de Langerhans son de morfología ovalada u esférica y presentan un tamaño variable que abarca desde pequeñas agrupaciones de sólo unas pocas células endocrinas hasta grandes agregados formados por varios miles de ellas. Los islotes, que se encuentran distribuidos por el

parénquima exocrino entre los acinos y las estructuras ductales (Figura 1), constituyen entre el 1 y el 4 % del volumen total del páncreas tanto en ratones como en humanos. Pese al bajo valor porcentual que representan, estos micro-órganos se encuentran altamente vascularizados y reciben alrededor del 10-15 % del total de flujo sanguíneo pancreático (Dolenšek *et al.*, 2015; Leung, 2010a).

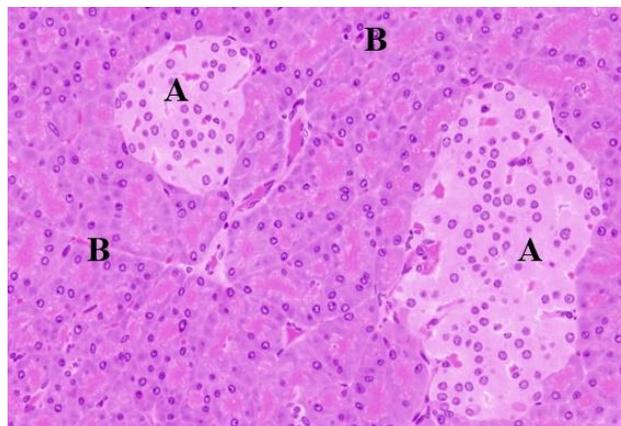


Figura 1. Histología del páncreas de ratón (*Mus musculus*). Se muestra una sección histológica (8 μm de parafina) del páncreas de ratón sometida a tinción con hematoxilina-eosina. Se hallan representados los isletos de Langerhans (A) y los acinos pancreáticos (B) que los rodean. Imagen modificada de MEGÍAS, 2021.

Los tipos de células que conforman los isletos de Langerhans se conocen como células alfa, células beta, células delta, células PP o F, y células epsilon (In't Veld y Marichal, 2010). Las células de los isletos se comunican entre sí, influyéndose mutuamente en sus funciones secretoras (Leung, 2010b). Así pues, la proporción en la que se hallan los diferentes tipos de células endocrinas puede ser relevante en la regulación del metabolismo. En este contexto, el ratio en el que se encuentran los diferentes tipos de células de los isletos varía en humanos y primates con respecto a los roedores. Más concretamente, en ratones las células β constituyen, aproximadamente, el 77 % del total de tipos celulares en los isletos, mientras que en el ser humano la proporción se encuentra en torno a 55 %. Del mismo modo, las células α representan en ratones cerca de un 18 % del total de tipos celulares, en tanto en humanos el valor asciende hasta un 38 % (Proshchina *et al.*, 2019). Por consiguiente, el ratio entre células β y células α es mayor en ratones que en humanos. Asimismo, las células δ y PP representan un porcentaje inferior al 5 % del total de células de los isletos en ratones y al 10 % en humanos. Finalmente, las células ϵ se hallan en una proporción inferior a 1 % en ambas especies (Dolenšek *et al.*, 2015).

Cabe añadir que las secreciones hormonales a la vena porta por parte de todos estos tipos celulares están moduladas por factores de señalización procedentes del interior y el exterior del páncreas (Leung, 2010b). Las células β son las responsables de producir insulina en respuesta a variaciones en los niveles de nutrientes en el plasma, como la glucosa, aminoácidos y ácidos grasos. De hecho, el principal estímulo para la secreción de insulina es la entrada de estos nutrientes en la célula β . La secreción de dicha hormona peptídica, cuya acción es hipoglucemiante, también se produce como consecuencia de la influencia de la propia insulina, el péptido similar al glucagón tipo 1, o el péptido inhibidor gástrico, entre otras hormonas intestinales. Sin embargo, la secreción de insulina se ve disminuida en un contexto de ayunas y/o ejercicio físico, así como por la acción de la somatostatina. Por otra parte, las células α sintetizan

glucagón, el cual ejerce el efecto opuesto a la insulina. Más concretamente, el glucagón actúa promoviendo un aumento de los niveles de glucosa en sangre mediante la estimulación de la glucogenólisis y de la gluconeogénesis. De esta manera, la secreción de esta hormona peptídica se activa en condiciones de hipoglucemia y se inhibe en un escenario hiperglucémico (Leung, 2010a). En tercer lugar, las células δ liberan somatostatina, hormona inhibidora de la secreción de insulina y glucagón (In't Veld y Marichal, 2010). Con respecto a las células PP o F, la hormona liberada es el péptido pancreático, cuya secreción se incrementa con la ingesta de proteínas y grasas y la hipoglucemia, mientras que se ve disminuida por la glucosa (Leung, 2010a). Finalmente, las células ϵ se caracterizan por secretar ghrelina, la cual estimula el apetito, así como la lipogénesis (Poher *et al.*, 2018).

Como se observa en la Figura 2, la disposición de las células endocrinas en los islotes también difiere según la especie. Más específicamente, en ratones las células β se extienden por toda la zona central del islote, mientras que las células alfa y las delta se encuentran restringidas a la periferia. En cambio, en primates y humanos las células α y las δ no se limitan a una zona específica del islote, sino que se encuentran entremezcladas con el resto de los tipos celulares tanto en el centro como en la periferia (Brereton *et al.*, 2015).

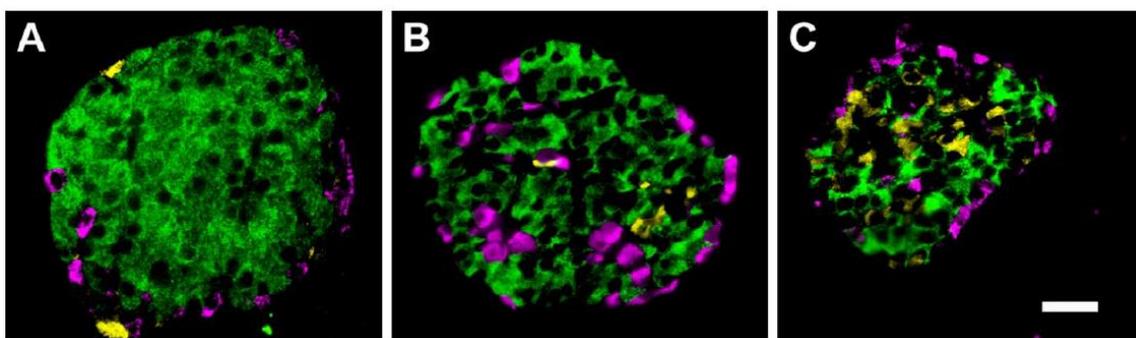


Figura 2. Imágenes del marcaje inmunofluorescente de islotes de Langerhans ilustrativas de las diferencias interespecie en la disposición de los tipos de células endocrinas. Se muestra en color verde la insulina, en rosa el glucagón, y en amarillo la somatostatina, para los islotes de ratón (A), primate (B) y humano (C). Se observa la localización periférica de las células productoras de somatostatina y de glucagón (células δ y α , respectivamente), así como la disposición central de las productoras de insulina (β) en los islotes de ratón. Asimismo, se distingue que en los islotes de primate y humano las células α y δ se encuentran tanto en la periferia del islote como hacia el centro del mismo. Escala, 200 μ m. Imagen recuperada de Brereton *et al.*, 2015.

1.2.2 El páncreas endocrino en la condición diabética

Como se ha explicado en el apartado 1.1.1, en un estado prediabético caracterizado por la resistencia a la insulina, se produce una respuesta compensatoria por parte del páncreas endocrino. Esta respuesta se basa en un aumento de la funcionalidad secretora de insulina y de la masa de las células β , lo cual permite la adaptación de estas células a la mayor demanda de insulina en tal estado. Con los niveles de insulina incrementados, pese a la disminución de la sensibilidad a la hormona, se logra mantener la normoglucemia. A su vez, la secreción aumentada de insulina conduce a una condición de hiperinsulinemia en los sujetos. Cabe destacar que la expansión adaptativa de las células β se produce gracias a un aumento en la formación de nuevas células, así como a una disminución en la apoptosis de las mismas. Con respecto a la primera, se ha propuesto

que la generación de nuevas células se basa en la replicación de las ya existentes, si bien no se descarta la neogénesis a partir de precursores inmaduros (Sachdeva y Stoffers, 2009).

Con todo, llega un momento en el que las células β dejan de poder ajustarse a las necesidades de insulina debido a un agotamiento funcional. Es entonces cuando los individuos evolucionan del estado prediabético a la diabetes tipo 2 y su asociada tolerancia alterada a la glucosa. Más concretamente, en la progresión a la DM2 se produce un descenso gradual en la masa y funcionalidad de las células β (González *et al.*, 2013). En este sentido, tal y como se observa en la Figura 3, la evolución de la disfunción compensatoria coincide con niveles crecientes de glucosa en sangre debido a una inadecuada secreción de insulina. Eventualmente, el fallo compensatorio de las células beta desencadena un estado de DM2 manifiesta (Sachdeva y Stoffers, 2009).

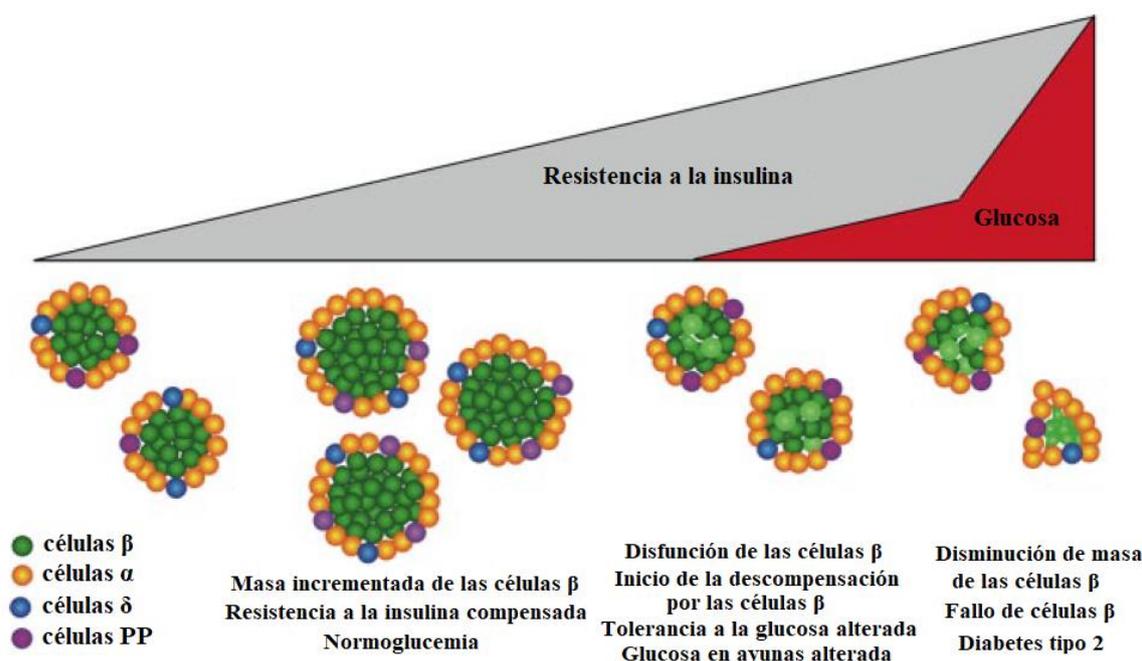


Figura 3. Representación de la evolución de las células beta desde el estado prediabético, caracterizado por una resistencia periférica a la insulina, hasta la condición de diabetes tipo 2, vinculada a la intolerancia a la glucosa. Se representa en color gris una fase inicial de compensación de la resistencia a la hormona por parte de las células beta gracias a un aumento en su masa. En color rojo se simbolizan los niveles plasmáticos crecientes de glucosa, que culminan con la manifestación de la diabetes mellitus tipo 2, en consonancia con una disfunción progresiva de las células beta. Imagen modificada de Sachdeva y Stoffers, 2009.

1.3 Sustratos del receptor de insulina

Los sustratos del receptor de insulina (*Insulin Receptor Substrates*, IRS) constituyen una familia de proteínas adaptadoras citoplásmicas que funcionan como intermediarias esenciales de señalización aguas abajo de numerosos receptores de membrana (Mardilovich *et al.*, 2009). Pese a que estas proteínas fueron identificadas inicialmente como mediadoras de los efectos pleiotrópicos de la insulina e IGF-1 (factor de crecimiento similar a la insulina de tipo 1), interactuando con los receptores de ambos, también se unen a receptores de citoquinas y de hormonas, y están implicadas en procesos como el cáncer, el crecimiento cerebral y el desarrollo

testicular (Withers *et al.*, 1998; Griffeth *et al.*, 2013; Schubert *et al.*, 2003; Mardilovich *et al.*, 2009; MACHADO-NETO *ET AL.*, 2016).

Desde un punto de vista estructural, las proteínas IRS se caracterizan por contener dos dominios altamente conservados: un dominio de homología de tipo pleckstrina (*Pleckstrin Homology*, PH) y un dominio de unión a fosfotirosina (*Phosphotyrosine Binding*, PTB), los cuales se localizan en el extremo N-terminal de la proteína. Al no poseer actividad enzimática intrínseca, las proteínas IRS contribuyen a la señalización a través de su función como adaptadoras, y de ahí la presencia en las mismas de dominios que les permiten ser reclutadas en receptores activados. En este sentido, el dominio PH permite que las proteínas IRS se unan a otras proteínas, facilitando así su reclutamiento en los receptores que se encuentran aguas arriba en la cascada de señalización. Por su parte, el dominio PTB interactúa con motivos NPXY (Asn-Pro-X-Tyr) en receptores activados (Mardilovich *et al.*, 2009). Además de dichos dominios, las proteínas IRS presentan entre 8 y 18 sitios de fosforilación de tirosina, de manera que, una vez fosforilados por los receptores, se unen a proteínas efectoras de la cascada. Cabe destacar que las proteínas IRS se activan por fosforilación de residuos de tirosina, mientras que están reguladas negativamente por tirosinas fosfatasas, la fosforilación de residuos de serina y la regulación negativa inducida por ligando (Taniguchi *et al.*, 2006; Burks y White, 2001).

Dentro de la familia de proteínas IRS se distinguen varios miembros. IRS1 e IRS2 se encuentran ampliamente distribuidas y constituyen las principales mediadoras de la mitogénesis dependiente de insulina y de la regulación del metabolismo de la glucosa en la mayoría de los tipos celulares (Mardilovich *et al.*, 2009). IRS3, que se expresa en roedores y no en humanos, se limita principalmente a los adipocitos y al cerebro, mientras que IRS4, la cual se expresa exclusivamente en humanos, se localiza en el cerebro, el riñón, el timo y el hígado. En cambio, IRS5 e IRS6 guardan una relación más lejana con el resto de los miembros de la familia y parecen tener una expresión tisular limitada (Taniguchi *et al.*, 2006; Mardilovich *et al.*, 2009).

Los diferentes miembros de la familia IRS también difieren atendiendo a los dominios estructurales que presentan más allá de los altamente conservados PH y PTB (Figura 4). Así pues, únicamente IRS2 posee el dominio KRLB (*Kinase Regulatory Loop Binding*), el cual también participa en el reclutamiento en el receptor activado. Tal y como se ha indicado anteriormente, tras interactuar y ser fosforiladas por los receptores aguas arriba, algunos miembros de la familia IRS adquieren sitios de unión específicos de diferentes proteínas efectoras, entre las cuales destacan Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*), PI3K (fosfoinositol 3-quinasa), SHP2 (*Src homology region 2 (SH2)-containing protein tyrosine phosphatase 2*) y Nck (Mardilovich *et al.*, 2009; Burks y White, 2001).

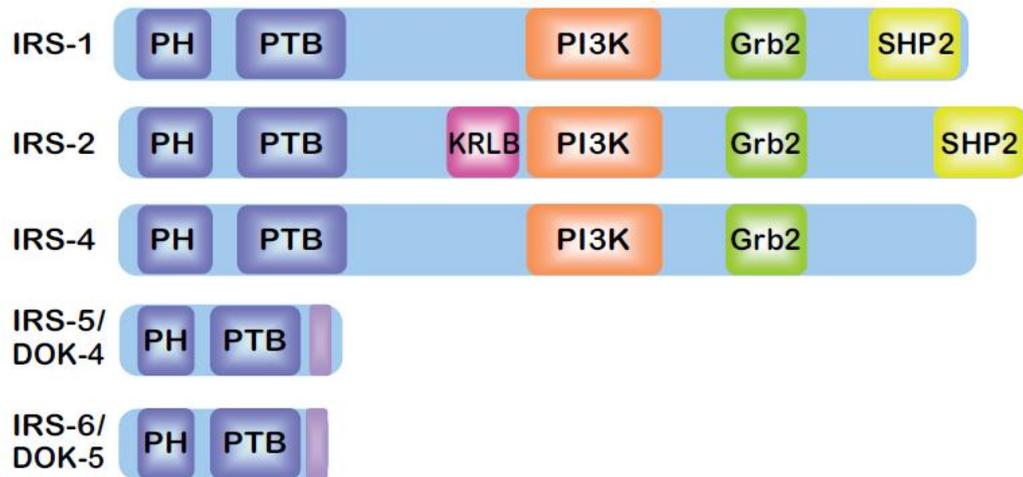


Figura 4. Esquema de los dominios estructurales de la familia proteica IRS (sustratos del receptor de insulina). Se representan en azul oscuro el dominio de homología de tipo pleckstrina (*Pleckstrin Homology*, PH) y el dominio de unión a fosfotirosina (*Phosphotyrosine Binding*, PTB), localizados en los extremos N-terminal de todos los miembros (IRS1-IRS6). En color rosa se esquematiza el dominio KRLB (*Kinase Regulatory Loop Binding*), localizado exclusivamente en IRS2 (sustrato del receptor de insulina de tipo 2). En color naranja, verde y amarillo se observan los sitios de unión a las proteínas efectoras PI3K (fosfoinositol 3-quinasa), Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*) y SHP2 (*Src homology region 2 (SH2)-containing protein tyrosine phosphatase 2*), respectivamente. En color lila se simbolizan regiones de similares entre los miembros IRS5 e IRS6 en sus extremos C-terminal. Imagen recuperada de Mardilovich *et al.*, 2009.

El papel de las proteínas IRS ha sido estudiado empleando modelos de ratón *knock-out*. Los ratones con ablación del gen *IRS2* presentan un fenotipo diabético: resistencia periférica a la insulina, así como un fallo funcional de las células beta pancreáticas asociado a una reducción de su masa en un 50 %. En este sentido, dichos ratones han mostrado carecer del mecanismo compensatorio basado en expandir las células beta ante una situación de resistencia a la insulina. El modelo *knock-out* para *IRS2* también presenta defectos en el crecimiento cerebral e incluso una fertilidad mermada. En contraposición, el modelo murino con delección en el gen *IRS1* exhibe una resistencia leve a la insulina y una reducción en el crecimiento somático. A diferencia de los ratones carentes de *IRS2*, los ratones *IRS1*^{-/-} no progresan a un estado diabético ya que mantienen un número normal de células beta pancreáticas. Así pues, de entre todas las funciones de las proteínas IRS, cabe destacar el rol de *IRS1* en la regulación del crecimiento somático, así como el papel de *IRS2* en la proliferación de los islotes pancreáticos y la mediación de los efectos de la insulina (Burks y White, 2001; Mardilovich *et al.*, 2009).

1.3.1 IRS2

IRS2 es un mediador clave en numerosas rutas de señalización activadas por receptores de insulina, de citoquinas y de hormonas. En este sentido, está implicado en la regulación de una serie de efectos metabólicos y vinculados al crecimiento en diferentes tejidos diana. *IRS2* interacciona a través de sus dominios de tipo PH y PHB con receptores de tirosina quinasa, como el receptor de insulina o el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1R). Dichos receptores fosforilan residuos de tirosina en *IRS2*, lo cual conduce a la activación de las cascadas de PI3K/AKT/mTOR (*mechanistic target of rapamycin*), así como de MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos), las cuales modulan numerosos procesos, como la

proliferación y supervivencia celular, así como la síntesis proteica y la expresión génica. Cabe señalar que IRS2 también desempeña un importante papel en la proliferación y supervivencia celulares interaccionando con receptores de hormonas y citoquinas, tales como el receptor de eritropoyetina, el receptor del factor de crecimiento endotelial-vascular, así como receptores de interleuquinas (MACHADO-NETO *ET AL.*, 2016).

Con respecto a la señalización de la insulina, tras producirse la fosforilación de IRS2 en sus residuos de tirosina por el receptor de insulina o de IGF-1, IRS2 se une a través de dichos residuos a los dominios SH2 (*Src Homology region 2*) de proteínas efectoras de la cascada, como las anteriormente mencionadas PI3K, Grb2, Nck y SHP2. En consecuencia, se activan rutas de señalización que en última instancia determinan la respuesta celular a la insulina o IGF-1. Más específicamente, los productos de PI3K, como el fosfatidilinositol-3,4-bisfosfato (PI3,4P₂) y el fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato (PI3,4,5P₂), activan una red de quinasas incluyendo mTOR, así como las isoformas de PKC (proteína quinasa C) y de PDK (*phosphoinositide-dependent protein kinase 1*). Dichas quinasas están implicadas en mediar la acción de la insulina sobre el transporte de glucosa, la síntesis de glucógeno, la síntesis proteica, la anti-lipólisis, y el control de la gluconeogénesis (White, 2002; Burks y White, 2001).

1.4 El modelo reportero *knock-in* IRS2/Luciferasa/GFP

Pese al rol indispensable de IRS2 en la función y expansión de los islotes pancreáticos, su detección en los mismos mediante el uso de anticuerpos es compleja debido al reducido nivel de expresión, el tamaño de la proteína y la especificidad de los anticuerpos. Es por ello que, junto con la posibilidad añadida de poder caracterizar las funciones de IRS2 en diferentes tejidos en distintas etapas de la vida o en condiciones patológicas, el grupo de Neuroendocrinología Molecular del Centro de Investigación Príncipe Felipe ha generado un modelo murino IRS2-luciferasa-GFP mediante recombinación homóloga. En ratones, el gen *IRS2* se encuentra en la hebra reversa del cromosoma 8 y su transcrito presenta dos exones. La región codificante de la proteína ocupa la totalidad del primer exón y un reducido número de codones del segundo (ENSEMBL, 2021). Así pues, se ha insertado una construcción bicistrónica *eGFP-IRES-Luciferasa* en el segundo exón al final de la pauta codificante del gen *IRS2*, creando así una línea reportera de tipo *knock-in* IRS2-Luciferasa-eGFP (Figura 5).

GFP es una proteína fluorescente que absorbe luz azul y emite fluorescencia verde sin ningún sustrato exógeno, siendo su longitud de onda de excitación máxima a 395 nm y de emisión máxima a 509 nm (BIO TEK, 2001). *eGFP* (*enhanced Green Fluorescent Protein*), la cual se emplea en el modelo descrito, constituye una variante de GFP que presenta un espectro de fluorescencia modificado: longitud de onda de excitación máxima a 488 nm y de emisión máxima a 509 nm (Lipták *et al.*, 2019; BIO TEK, 2001). Por su parte, la luciferasa de luciérnaga es una enzima bioluminiscente. La bioluminiscencia se basa en la producción de luz mediante una reacción química. Más concretamente, se trata de una reacción enzimática por la cual la luciferasa genera luz a través de la liberación de energía química de sus sustratos, la luciferina y el ATP. Los ensayos basados en bioluminiscencia son muy sensibles y se basan en la detección de fotones empleando sistemas de medición de luz (luminómetros) (Azad *et al.*, 2014).

Así pues, las características de dichas proteínas reporteras posibilitarán la monitorización de la expresión génica endógena de *IRS2* *in vivo*, *ex-vivo* o *in vitro* mediante el uso del modelo

murino *knock-in*. Concretamente, empleando técnicas como ensayos de la actividad de luciferasa, citometría de flujo, y *western blot* se procederá a la caracterización del modelo, lo cual contribuirá a describir el rol de IRS2 en diferentes tejidos tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.

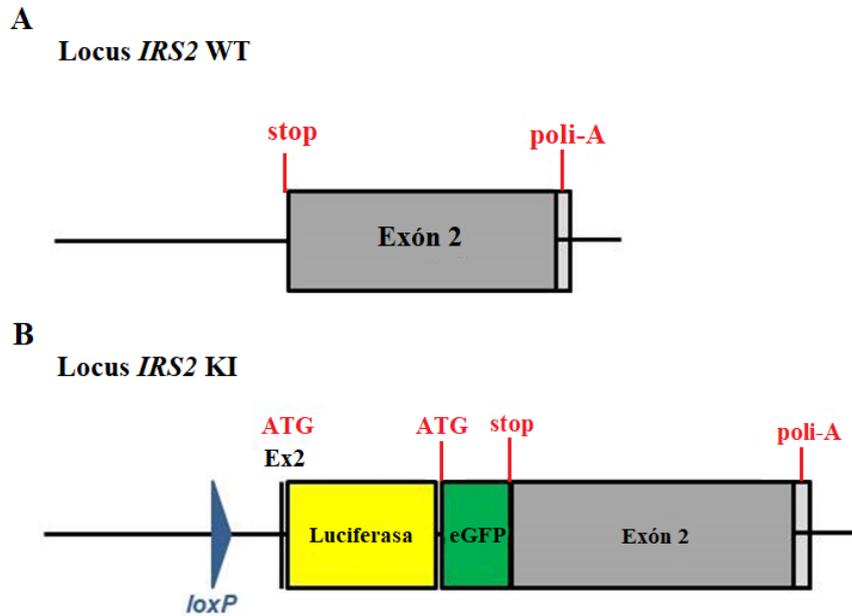


Figura 5. Esquema de las bases genéticas del modelo murino reportero *IRS2*/luciferasa/*GFP*. Se representa en gris el segundo exón del locus de *IRS2* (sustrato del receptor de insulina de tipo 2) en un ratón silvestre (*wild-type*, WT) (A), y en el locus *knock-in* (KI) (B). Se indican los codones de inicio y de parada, así como la cola de poli-adenina (poli-A). En el locus del modelo *knock-in* se esquematiza la inserción de la construcción génica basada en eGFP (*enhanced Green Fluorescent Protein*) y luciferasa al final de la pauta codificante de *IRS2*.

1.4.1 Expresión de *IRS2* en el bazo

Aunque es escasa la información al respecto, se conoce que *IRS2* se expresa en el bazo (THE HUMAN PROTEIN ATLAS, s. f.a; Zhuo *et al.*, 2016), concretamente, en linfocitos, macrófagos y células endoteliales del bazo humano (THE HUMAN PROTEIN ATLAS, s.f.b). No obstante, la función y participación de *IRS2* en las rutas de señalización en este órgano han sido mínimamente descritas. Inesperadamente, en el modelo reportero *knock-in IRS2*/Luciferasa/*GFP* el bazo constituye uno de los órganos donde mayor expresión de *IRS2* se ha observado, así como en los nódulos linfáticos y el timo (Figura 6). En este contexto, y dado que este órgano proporciona mayores rendimientos de RNA y proteínas que los islotes pancreáticos, se ha decidido seguir una línea de investigación complementaria con este.

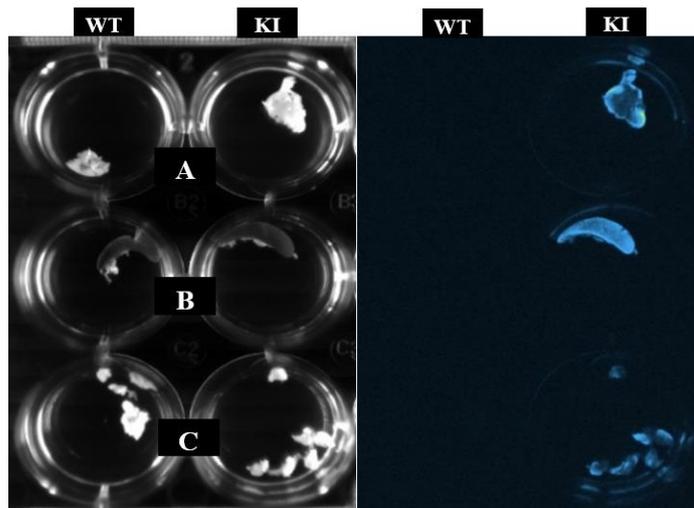


Figura 6. Imágenes de bioluminiscencia de luciferasa para la caracterización de la expresión de IRS2 (sustrato del receptor de insulina de tipo 2) en tejidos inmunes aislados. Se muestran las imágenes del timo (A), el bazo (B) y los nódulos linfáticos (C) de un ratón *wild-type* (WT) y *knock-in* (KI); las imágenes en blanco y negro a la izquierda de la imagen y las imágenes correspondientes de bioluminiscencia a la derecha.

En ratones, ratas y humanos el bazo es un órgano linfático localizado en la parte superior de la cavidad abdominal con una estructura histológica basada en una parte central o pulpa blanca embebida en una parte externa o pulpa roja (Steiniger, 2015; MEGÍAS, 2021). En ratones el bazo constituye el órgano más relevante para la recirculación de linfocitos y también está implicado en la depuración de antígenos, microorganismos y glóbulos rojos envejecidos de la sangre, así como en las etapas finales de la maduración de linfocitos B (Steiniger, 2015).

Como se observa en la Figura 7, en ratas, al igual que en ratones, en la periferia del bazo se localiza la llamada cápsula, la cual está constituida por tejido conectivo fibroso, fibras elásticas y músculo liso. Hacia el interior de este órgano la cápsula da lugar a tabiques que compartimentan el bazo de manera que en cada compartimento se distinguen las anteriormente mencionadas pulpa blanca (interna) y pulpa roja (externa). El conjunto de las diferentes zonas delimitadas por los tabiques se conoce como parénquima del bazo, siendo el tejido restante el denominado estroma (MEGÍAS, 2021). La pulpa blanca, que es predominante, está compuesta por acumulaciones de linfocitos T y B, la envuelta periarterial linfoide o PALS (del inglés, *periarterial lymphatic sheaths*), folículos y la zona marginal. Por su parte, la pulpa roja está integrada por una densa red de arteriolas, capilares y senos venosos, además de presentar diferentes tipos de células sanguíneas como eritrocitos, granulocitos y monocitos (Steiniger, 2015; MEGÍAS, 2021).

Dada esta estructura tan definida, la inmunodetección de las proteínas reporteras del modelo *knock-in* IRS2-Luciferasa-GFP en secciones tisulares del bazo, podría contribuir a la determinación de qué tipo o tipos celulares presentes en este tejido expresan altos niveles de IRS2.

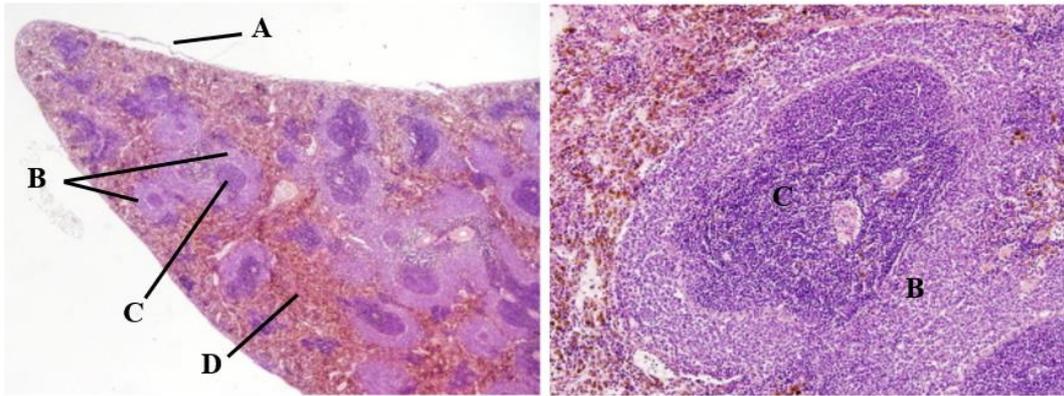


Figura 7. Histología del bazo de rata (*Rattus norvegicus*). Se muestran secciones de parafina con tinción de tipo hematoxilina-eosina. El bazo se encuentra externamente rodeado por la cápsula (A). Asimismo, se distinguen regiones conformadas por pulpa roja (B) y pulpa blanca (C), las cuales, en su conjunto, constituyen el parénquima de este órgano. La región no parenquimatosa se denomina estroma (D). En las presentes imágenes no se aprecia el color fisiológico rojo y blanco de las pulpas dado que el animal ha sido desprovisto de su sangre previamente a la tinción. Imagen modificada de MEGÍAS, 2020.

2. Objetivos

El objetivo general del presente Trabajo Fin de Grado es la caracterización de la expresión de IRS2 en el modelo murino doble reportero *IRS2/luciferasa/GFP* con el fin de ahondar en el rol de IRS2 en los islotes pancreáticos y el bazo.

Los objetivos específicos son:

1. Analizar si la expresión de IRS2 varía con la edad en los islotes pancreáticos y el bazo a través de la detección de GFP y/o luciferasa mediante *western blot*.
2. Estudiar la proliferación celular en las poblaciones GFP+ y GFP- de islotes pancreáticos mediante citometría de flujo.
3. Establecer las condiciones técnicas necesarias para separar las células GFP+ y GFP- de islotes del modelo reportero a través de citometría de tipo FACS.

3. Materiales y Métodos

3.1 Animales

En el presente proyecto se emplearon ratones C57BL/6J *wild-type* y ratones pertenecientes a la línea reportera *knock-in* IRS2-luciferasa-GFP. Para la caracterización de la expresión endógena de *IRS2* se utilizaron machos y hembras de diferentes edades. Los animales fueron mantenidos en las condiciones de estabulación estándar del servicio de animalario del Centro de Investigación Príncipe Felipe, con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y libre acceso a comida y agua.

3.2 Aislamiento de tejidos

Para la extracción de islotes pancreáticos y bazo, los ratones fueron sacrificados mediante suministro de CO₂ o dislocación cervical, tras lo cual, se abrió el abdomen y, tras localizar el conducto hepatobiliar que conecta el hígado y la vesícula biliar con el duodeno, se practicó un nudo en su unión con el intestino para bloquear la transferencia de líquido. Posteriormente, con una jeringa y una aguja de calibre 30G se perfundió el páncreas a través de un corte practicado en el segmento medio del conducto hepatobiliar. La solución de aislamiento (NaCl 115 mM; NaHCO₃ 10 mM; KCl 5 mM; MgCl₂ 1,1 mM; Na₂HPO₄ 1,2 mM; HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico) 25 mM; CaCl₂ 2,5 mM; D-glucosa 5 mM; BSA 0,25 %) contenía 1000 U/mL de colagenasa (Sigma-Aldrich) para digerir la porción exocrina del páncreas y poder separar de ella los islotes de Langerhans o parte endocrina del páncreas.

Una vez perfundido, se extrajo el páncreas hinchado y se incubó 10 minutos en un baño de agua a 37°C para favorecer la acción de la colagenasa. La disgregación del páncreas exocrino se completó mecánicamente mediante agitación y se procedió a la recogida manual de islotes, que se separaron del tejido exocrino con micropipeta. Una vez libres de tejido exocrino, se hicieron grupos de unos 300 islotes (de cada ratón o agrupando de varios) y se conservaron a -80°C en tampón de lisis hasta su procesamiento para la extracción de proteína. Alternativamente, los islotes se transfirieron a una placa con medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco) y se dejaron recuperar durante al menos 2 horas en un incubador (37°C, 5% CO₂) antes de proceder con el procesamiento para citometría.

En lo que respecta al bazo, este fue extraído paralelamente tras ser separado del páncreas. Fue lavado con PBS (*Phosphate-Buffered Saline*), introducido en tubo Eppendorf, congelado en nitrógeno líquido y conservado a -80°C hasta su uso.

3.3 Citometría de flujo y FACS

Tras ser incubados tal y como indica la sección 3.2, los islotes fueron disgregados para obtener una suspensión de células individuales. Para ello, grupos de unos 100 islotes (para análisis por citometría de flujo) o de unos 600 islotes (para FACS) fueron lavados con PBS, centrifugados a 1200 rpm durante 4 minutos, y disgregados con tripsina – EDTA (ácido etilenodiaminatetraacético) 0,05 % (Gibco) durante 3 minutos a 37°C. La disgregación se completó mecánicamente mediante pipeteo, se bloqueó la acción de la tripsina con RPMI 1640 y se realizó una centrifugación a 1400 rpm durante 10 minutos.

Con respecto al procesamiento para la citometría de tipo FACS, tras la centrifugación, las células de islotes fueron resuspendidas en tampón para FACS (BSA 0,5% (Sigma-Aldrich); EDTA 2 mM; FBS (*Fetal Bovine Serum*) 10%, en PBS) y fueron transferidas a tubos de polipropileno de citometría previa filtración con filtro de 30-40 μm . La separación de las células GFP+ y GFP- se llevó a cabo en un citómetro de flujo *SONY SH800 Cell Sorter*.

En lo que a la citometría de flujo convencional se refiere, la resuspensión se realizó con medio RPMI 1640. Tras ser transferidas a tubos de polipropileno de citometría tal y como se ha descrito en el párrafo anterior, se añadió Hoechst 33342 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Sigma-Aldrich) y fueron incubadas a 37°C durante 30 min para asegurar la penetración del colorante en las células. El citómetro de flujo empleado para la estimación de la proliferación celular fue un *CytoFLEX S* (Beckman Coulter). Se emplearon islotes de 2 hembras *wild-type* y de 4 hembras *knock-in* de 12 meses.

3.4 Extracción de proteína

Para la extracción de proteína de islotes (unos 300 islotes/muestra), que estaban preservados en tampón de lisis con inhibidores de proteasas (5% Tris-HCl 1M pH 7,5; 4% NaCl 5M; 2% NP40 Lp Gul al 10%; 5% Tween-20 al 20%; en H₂O destilada, fluoruro de fenilmetilsulfonilo, ortovanadato de sodio, β -glicerol fosfato y Complete PRotease Inhibitor Cocktail) a -80°C desde el aislamiento, estos fueron sonicados en un baño (Bioruptor®, Diagenode) empleando 3-4 ciclos de 10 segundos. A continuación, se incubaron en hielo durante 45 minutos y se centrifugaron durante 15 minutos a 13.000 rpm y 4°C. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo y se guardó el extracto proteico para determinar la concentración de proteína total.

Para la extracción de proteína del bazo, el cual estaba preservado a -80°C, se cortó una sección de cada bazo y se homogeneizó mecánicamente en el tampón de lisis con inhibidores de proteasas, anteriormente descrito, en el interior de tubos Eppendorf. A continuación, se incubaron los extractos a 95°C durante 5 minutos y se sonicaron 3 veces durante 5-6 segundos empleando el sonicador *Branson Sonifier 150*. Finalmente, se centrifugaron durante 15 minutos a 13.000 rpm y 4°C, y se guardó el sobrenadante para la cuantificación de proteína.

La concentración de proteína total presente en cada muestra se determinó mediante el método del ácido bicinconínico (BCA) utilizando el kit *PierceTM BCA Protein Assay Kit* (Thermo ScientificTM). Cada muestra fue diluida en el tampón de lisis descrito en la sección anterior y se empleó como sustrato de la reacción una solución compuesta por el reactivo A (196 $\mu\text{L}/\text{muestra}$) y el reactivo B (4 $\mu\text{L}/\text{muestra}$). Se utilizó el reactivo de concentración conocida *Albumin Standard* con concentraciones 0, 0,125, 0,250, 0,5, 1 y 2 mg/mL. Tras la adición del sustrato, la placa fue incubada durante 30 minutos a 37°C en agitación y en oscuridad. La absorbancia se midió con el fotómetro de microplacas *Multiskan FC* (Thermo ScientificTM) a 560 nm de longitud de onda. Con los valores de absorbancia y concentración de los pocillos a los que se les había añadido el reactivo estándar se generó una curva patrón para, a partir de esta, calcular la concentración de proteína total de las muestras.

3.5 Western blot

Para la inmunodetección de las proteínas del modelo reportero GFP y luciferasa en islotes y bazo se realizó *western blot*. Para la determinación en islotes de ratones de diferentes edades, el

número de muestras analizadas fue de 4-5 para cada edad, mientras que en el caso del bazo se analizaron 3 muestras por cada grupo.

3.5.1 Preparación de muestras y geles de poliacrilamida

Los extractos de proteína (30 µg de las muestras de islotes y 20 µg de bazo) se prepararon junto con el tampón de carga (12,5% Tris-HCl pH 6,8; 9% SDS (dodecilsulfato sódico); 50% glicerol al 87%; 0,015% azul de bromofenol al 0,03%; 10% β-mercaptoetanol (Sigma Aldrich)). Las muestras fueron hervidas a 95°C durante 5 minutos, se les aplicó una centrifugación corta y fueron mantenidas a temperatura ambiente antes de ser cargadas en los geles de poliacrilamida. Considerando el peso molecular de GFP (27 kDa) y de luciferasa (62 kDa), se eligió para la parte separadora del gel un porcentaje de acrilamida de 10 %. El marcador de peso molecular empleado fue *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* (Bio-Rad). Para la preparación de la parte separadora (*resolving*) y la parte concentradora (*stacking*) del gel se emplearon los compuestos descritos en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición de la parte separadora y concentradora de los geles de poliacrilamida empleados en el *western blot*.

Componente	Parte separadora (10 % acrilamida)	Parte concentradora (4,5 % acrilamida)
H ₂ O destilada	2,39 mL	2,46 mL
<i>Resolving Buffer</i> (Tris-HCl 1,5M pH 8,8; SDS 0,4 %)	3 mL	-
<i>Stacking Buffer</i> (Tris-HCl 0,5M pH 8,8; SDS 0,4 %)	-	1 mL
Glicerol para biología molecular, ≥99,0 %	2 mL	-
Acrilamida 40 % (<i>Acrylamide/Bis Solution</i>) 29:1 (Bio-Rad)	2,5 mL	0,5 mL
Persulfato amónico 10 % (Bio-Rad)	100 µL	40 µL
TEMED (<i>N, N, N', N'- Tetramethylethylenediamine</i>), ~99 % (Sigma-Aldrich)	10 µL	4 µL

3.5.2 Electroforesis y transferencia húmeda

La electroforesis tuvo lugar en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE, *Sodium Dodecyl Sulfate Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis*) empleando el sistema *Mini-PROTEAN®* de Bio-Rad. Se utilizó tampón de electroforesis, que se compuso de: 0,3 % Tris (Sigma-Aldrich); 1,44% Glicina (Sigma-Aldrich); 0,1% SDS, en H₂O destilada. El proceso se produjo a 70 V hasta que el frente atravesó la parte concentradora. Posteriormente, se aumentó el voltaje hasta 120 V.

Finalizada la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a membranas de fluoruro de polivinilideno (PDVF) (Bio-Rad) mediante transferencia húmeda. Se empleó tampón de transferencia (0,302 % Tris; 1,442 % Glicina; 10 % metanol (Merck); en H₂O destilada). Ambas

membranas fueron previamente activadas con metanol. El proceso de transferencia tuvo lugar durante 1 hora y media en agitación, con un voltaje de 120 V y a 4°C.

3.5.3 Bloqueo y detección de GFP, luciferasa y beta-actina

Después de la transferencia, las membranas fueron bloqueadas con BSA (*Bovine Serum Albumin*) 3 % en TBS-T (*Tris-Buffered Saline-Tween 20*) (Tris 20 mM; NaCl 150 mM; Tween-20 0,1 % y H₂O destilada) durante al menos una hora a temperatura ambiente, e incubadas con el anticuerpo primario correspondiente durante toda la noche a 4°C y en agitación. Los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes: anti-GFP (Rockland™, producido en conejo, dilución 1:1000), anti-luciferasa (Abcam, producido en conejo, dilución 1:1000), anti-B-actina (Sigma Aldrich, producido en ratón, dilución 1:5000).

Para lavar el exceso de anticuerpo primario, las membranas fueron sometidas a 6 lavados de 10 minutos con TBS-T y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con HRP correspondiente (Cell Signaling Technology; anti-ratón, dilución 1:5000; anti-conejo, dilución 1:2000) durante al menos 2 horas a temperatura ambiente. Se realizaron lavados con TBS-T y TBS previamente al revelado, para el cual se empleó el sustrato quimioluminiscente sensible de Amersham™ *ECL Prime Western Blotting Detection Reagents* (GE Healthcare) o el sustrato de sensibilidad estándar Pierce™ *ECL Western Blotting Substrate* (Thermo Scientific™) en función de los niveles de expresión proteica. Para la detección de las bandas se utilizó el equipo de revelado para *western blot* Alliance Q9 Advanced (UVITEC). Una vez obtenidas las imágenes de las bandas, la intensidad de estas se cuantificó con el *software* del propio sistema de detección. Los valores de la β-actina de cada muestra se emplearon para normalizar la expresión de GFP y luciferasa.

3.6 Análisis estadístico

Los datos se muestran como la media aritmética ± el error estándar de la media. Se analizaron con el programa GraphPad Prism (v.8) y los grupos se compararon, dos a dos, mediante el test de la t de *Student*, usando como grupo control el de menor edad. La significancia estadística se estableció en un valor de $p \leq 0,05$ y los resultados del test estadístico se expresaron de la siguiente manera: *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$.

4. Resultados y discusión

4.1. Detección de GFP en islotes mediante *western blot*: la expresión de GFP aumenta con la edad.

Como se comentó en la Introducción, la detección de IRS2 en islotes mediante el uso de anticuerpos es compleja debido al nivel de expresión, el tamaño de la proteína y la especificidad de los anticuerpos. La generación del modelo *knock-in* facilita en gran medida el estudio de IRS2 a través de la detección de las proteínas reporteras mediante diferentes técnicas. En una primera aproximación para corroborar el funcionamiento del modelo reportero, y con el fin de estudiar si la expresión de IRS2 en islotes varía con la edad, se determinó la expresión de GFP en islotes de ratones hembra *knock-in* de 2, 12 y 18 meses mediante *western blot*. La proteína GFP tiene un tamaño mucho menor que el de IRS2 (27 kDa y 185 kDa, respectivamente) y una secuencia exógena al ratón que hacen que su detección mediante *western blot* sea más sencilla. Como puede observarse en la Figura 8, se observó un aumento de la expresión de GFP con la edad, siendo estadísticamente significativa la diferencia de expresión a los 12 y 18 meses con respecto a los 2 meses.

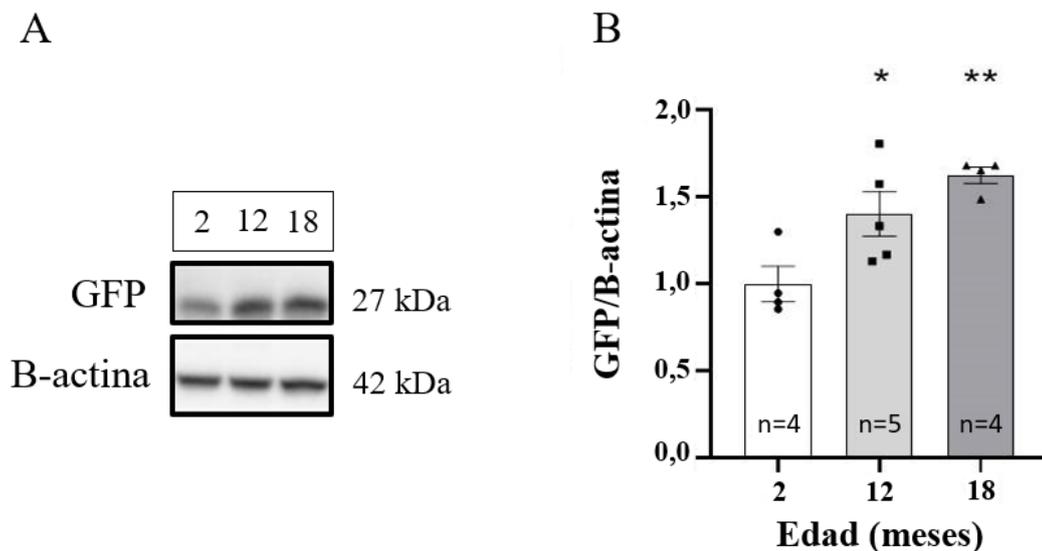


Figura 8. *Western blot* de proteína de islotes de ratones hembra *knock-in* de 2, 12 y 18 meses. A) Fragmento de la membrana con las bandas correspondientes a GFP y β -actina. B) Cuantificación relativa de la expresión de GFP.

Como era de esperar, la detección de GFP en los islotes concuerda con numerosos estudios previos que determinan la expresión de IRS2 en islotes y que describen la participación de esta proteína en la mediación de los efectos pleiotrópicos de la insulina; la proliferación y funcionalidad de las células β , así como en la mediación de los efectos antiapoptóticos de IGF-1 (factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1) (Burks y White, 2001; Withers *et al.*, 1999). En cambio, el aumento de la expresión de GFP con la edad fue, en principio, sorprendente, puesto que el envejecimiento se asocia con un estado de resistencia a la insulina (Evans y Goldfine, 2013). No obstante, un aumento en la expresión de IRS2 podría ser un mecanismo compensatorio frente a la resistencia a la insulina asociada al envejecimiento.

4.2. Análisis de la proliferación en células GFP+ y GFP- de islotes mediante citometría de flujo: las células GFP+ proliferan menos que las células GFP-

Además de estudiar la expresión de IRS2 en islotes de ratones *knock-in* mediante *western blot*, se analizó la proliferación celular en los mismos mediante la detección de fluorescencia de Hoechst y de GFP. En este sentido, como puede observarse en la Figura 9, la citometría de flujo permitió estimar la proliferación celular de forma diferencial en las poblaciones de células de islotes que expresan o no GFP.

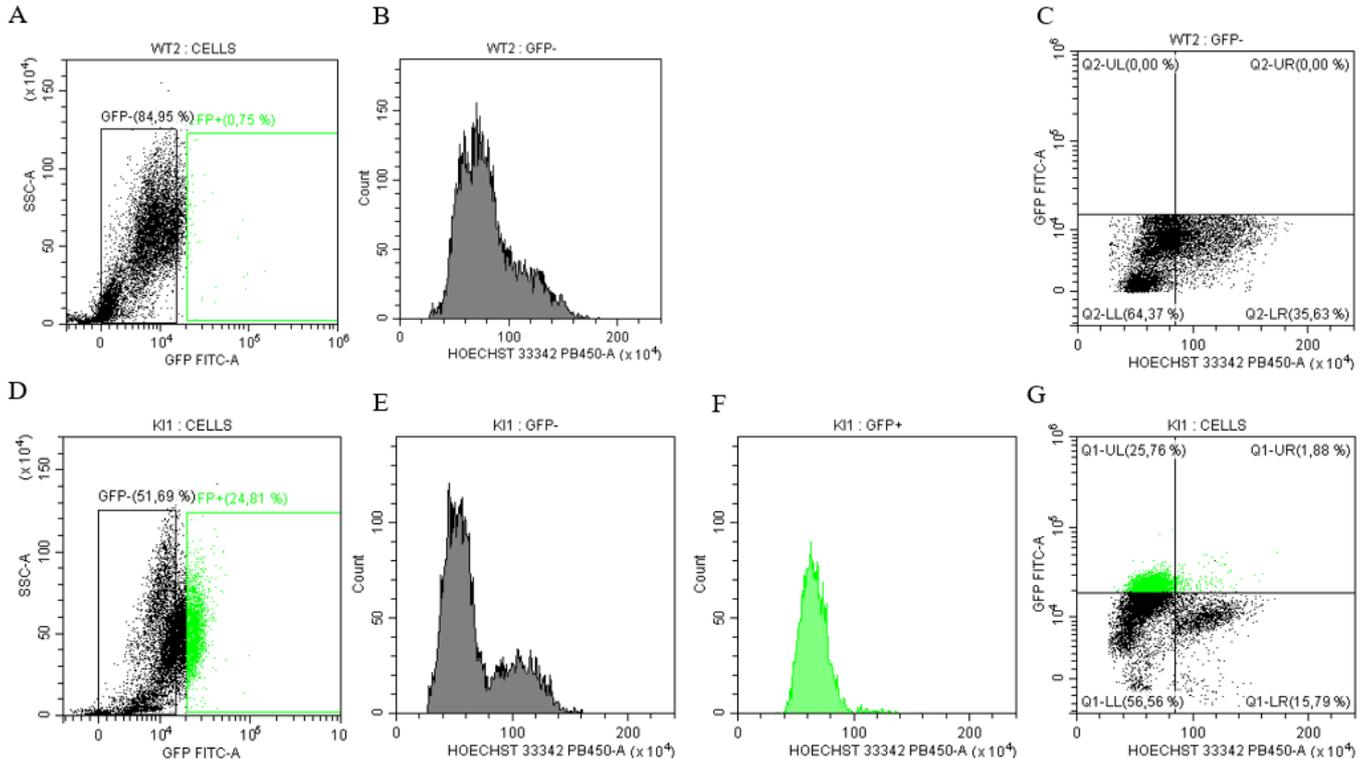


Figura 9. Análisis de la proliferación celular en células de islotes GFP+ y GFP- mediante citometría de flujo en ratones *wild-type* y *knock-in*. A) Acotamiento de las poblaciones GFP- y GFP+. B) Histograma de la señal detectada de Hoechst en células de ratón *wild-type*. C) Representación 2D de la señal de GFP y Hoechst en células de ratón *wild-type*. D) Células GFP+ y GFP- de ratón *knock-in*. E) Histograma de la señal detectada de Hoechst en células GFP- de ratón *knock-in*. F) Histograma de la señal detectada de Hoechst en células GFP+ de ratón *knock-in*. G) Representación 2D de la señal de GFP y Hoechst en células de ratón *knock-in*.

Interpretando la intensidad de señal de Hoechst como la cantidad relativa de DNA por célula, en la Figura 9 B y E (células que no expresan GFP) pueden observarse dos picos en el histograma. El primero de ellos, con una menor intensidad de Hoechst, correspondería a la población de células en fase G₀/G₁, mientras que el segundo correspondería a la población celular en fase S/G₂. Si se compara el tamaño de ambos picos, si bien existe un porcentaje de células considerable en fase S/G₂, se observa que la mayoría de las células se encuentran en fase G₀/G₁ (Figura 9 B y E; Figura 10). En cambio, si se observa el histograma de la señal de Hoechst correspondiente a las células GFP+ (Figura 9 F), puede apreciarse que el porcentaje de células en fase S/G₂ es mucho menor. En los paneles 2D (Figura 9 C y G) se puede observar también claramente que las células en fase S/G₂ (mitad derecha del panel) son, en su mayoría, negativas para GFP (cuadrante derecho inferior).

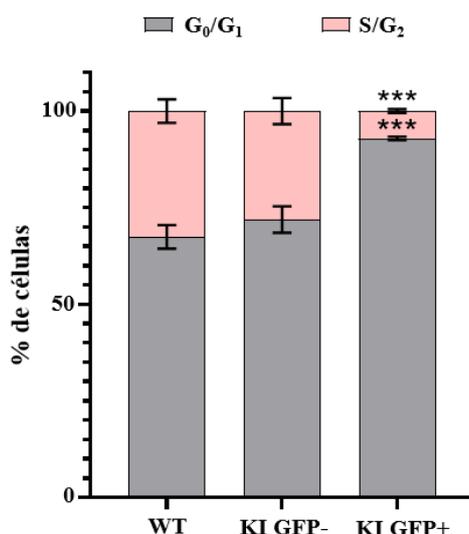


Figura 10. Representación gráfica de la proliferación celular en células de islotes *wild-type* (WT) y *knock-in* (KI) correspondiente a los datos de la Figura 9.

La detección de una mayor proporción de células replicativas (en fase S/G₂) en la población de células GFP⁻ que en la población GFP⁺ fue inesperado ya que una de las funciones descritas de IRS2 es la proliferación celular. A este respecto, Burks y White (2001) sugirieron que IRS2 regula la señalización mitogénica y que las rutas que media IRS2 son requeridas para el desarrollo normal de las células beta pancreáticas. Asimismo, propusieron que la señalización mediada por IGF-1/IRS2 regula el ciclo celular a través de Cdk4 (quinasa dependiente de ciclina 4), habiéndose observado tras la delección de Cdk4 una reducción en la masa de las células beta comparable a la obtenida en ratones carentes de IRS2 (Burks y White, 2001). Del mismo modo, Withers *et al.* (1998) establecieron que las rutas de señalización dependientes de IRS2 pueden ser importantes para las células que regulan las funciones proliferativas de los islotes (Withers *et al.*, 1998).

No obstante, el hecho de que las células GFP⁺ sean menos replicativas podría ser indicador de que sean más diferenciadas/maduras que las GFP⁻. Burks y White (2001) plantearon la hipótesis de que IRS2 regula un equilibrio entre la proliferación de los islotes de Langerhans y su diferenciación. Se sabe que IRS2 está involucrado en la proliferación de las células INS-1 (línea celular derivada de células beta) mediada por IGF-1, y que éste es una hormona reguladora de la diferenciación de diversos tipos celulares (Burks y White, 2001), por lo que es posible que IRS2 también esté implicado en mediar la función diferenciadora de IGF-1 en las células del páncreas endocrino. También en este sentido, estudios previos han descrito la participación de IRS2 en la diferenciación celular en otros tejidos. Los resultados reportados por Manzano-Núñez *et al.* (2019) sugieren que IRS2 está implicado en la diferenciación de los progenitores hepáticos. Constataron que la insulina exógena, la cual activa la ruta de señalización insulina/IRS2, es necesaria para que los hepatocitos se diferencien. De hecho, la inducción de resistencia a la insulina mediante el silenciamiento de *IRS1*, *IRS2* o el receptor de insulina, dio lugar a una diferenciación de los hepatocitos alterada en presencia de insulina (Manzano-Núñez *et al.*, 2019). Del mismo modo, Griffith *et al.* (2013) reportaron una expresión reducida de un factor de transcripción esencial en la diferenciación de los testículos (*SOX-9*, *SRY-box transcription factor 9*) en ratones carentes de IRS2. De forma análoga, resultaría plausible que IRS2 participe en la diferenciación de las células de los islotes pancreáticos.

4.3. Detección de GFP en células de islote y separación celular mediante FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) : puesta a punto de la técnica

Para poder llevar a cabo futuras determinaciones funcionales de expresión génica y proteica con poblaciones GFP+ y GFP- de islotes, es necesario establecer previamente las condiciones técnicas óptimas para dicha separación celular mediante FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*). Como puede observarse en la Figura 11, las poblaciones GFP+ y GFP- no están claramente diferenciadas debido a que, pese a ser imprescindible, la expresión de IRS2 en células de islote es muy reducida. Se estableció la población de células GFP- con células de ratón *wild-type* (Figura 11 A) y se consideró como GFP+ toda célula con una señal de GFP fuera de la zona delimitada como GFP-.

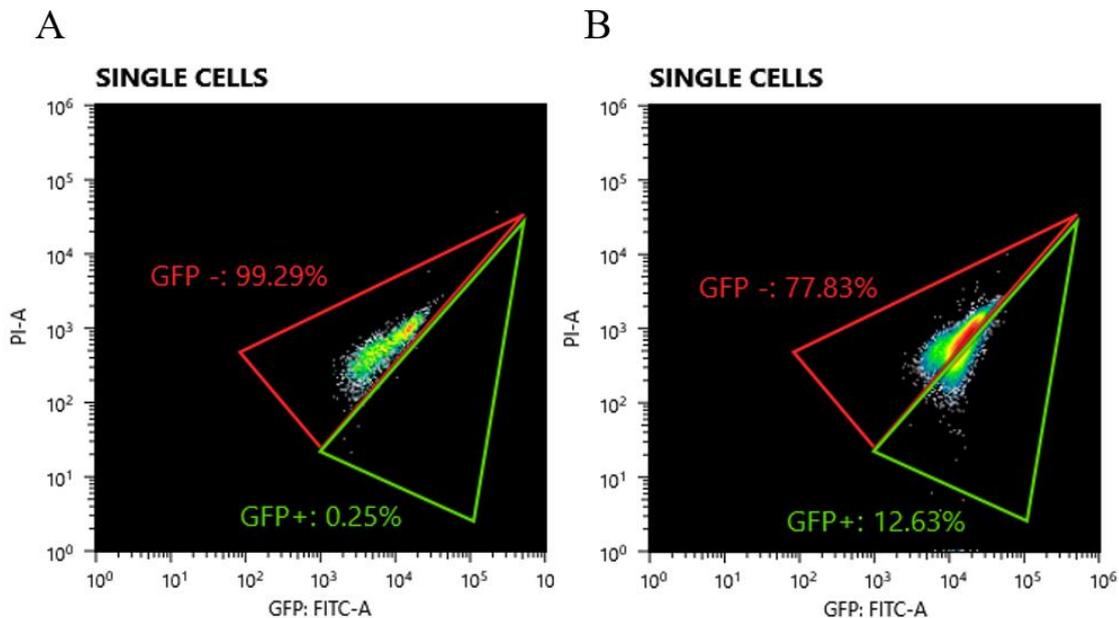


Figura 11. Estrategia de *sorting* establecida para la separación de poblaciones GFP+ y GFP- en islotes de ratón *knock-in*. A) Determinación de la población GFP- con células de islote de ratón *wild-type*. B) Diagrama representativo de las poblaciones GFP- y GFP+ de células de islote de ratón hembra *knock-in* de 12 meses.

Con la estrategia de *sorting* descrita, se consiguieron separar las poblaciones GFP+ y GFP- de cuatro hembras *knock-in* de 12 meses. A pesar de que la proporción de células GFP+ era similar en todas ellas (aproximadamente de un 12%) y de que el número inicial de islotes fue también similar en los cuatro ratones (unos 600 islotes), el rendimiento final de separación celular fue muy variable. El rango de células GFP- obtenidas fue de 19.000 a 116.000 y el de células GFP+ de 3.000 a 18.000 células. Con estas células se determinará, mediante cuantificación de la expresión de GFP/luciferasa por *western blot*, si la estrategia de separación celular es correcta o si, por el contrario, será necesario seguir ajustando las condiciones de separación mediante FACS.

4.4. Detección de GFP y luciferasa en bazo mediante *western blot*: la expresión de ambas proteínas reporteras aumenta con la edad.

Tal y como se ha indicado en la Introducción, la expresión de IRS2 en el bazo ha sido mínimamente reportada hasta la fecha. No obstante, el grupo detectó niveles elevados de actividad de luciferasa en dicho órgano en estudios anteriores con el modelo murino reportero (Figura 6).

Así pues, y dado el alto rendimiento de proteína que se obtiene a partir del bazo, se decidió estudiar la expresión de IRS2 mediante la detección de las proteínas reporteras. Mediante *western blot* se pudo cuantificar la expresión de GFP y luciferasa en el bazo de hembras *knock-in* de 2, 12 y 18 meses.

Como se observa en la Figura 12, tanto la expresión de GFP como de luciferasa, y por tanto de IRS2, aumentan con la edad, mostrando la misma tendencia que la expresión de GFP detectada en islotes pancreáticos (Figura 8). Analizando con más detalle los niveles de expresión de GFP y luciferasa, puede observarse que la determinación de GFP tiene una variabilidad mínima (Figura 12 C) y que a los 12 y 18 meses la expresión es el doble que a los 2 meses. En la Figura 12 B se observa un patrón similar, aunque la variabilidad para la detección de luciferasa es mayor. Dado que cabría esperar una expresión equivalente para GFP y luciferasa, esto podría deberse a un peor funcionamiento del anticuerpo anti-luciferasa. Otra posible explicación es el tamaño muestral; aumentando la N se esperaría ver una reducción de la variabilidad y unos valores más similares entre GFP y luciferasa.

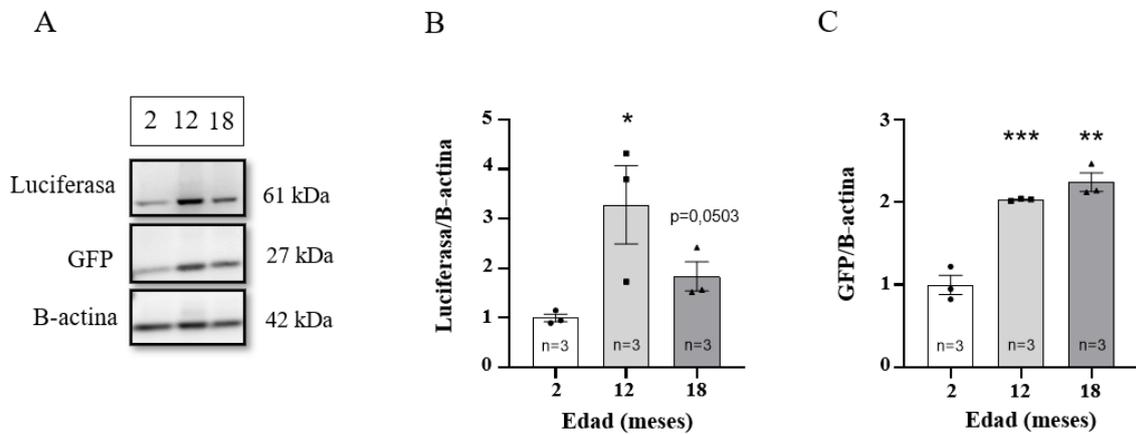


Figura 12. *Western blot* de proteína de bazo de ratones hembra *knock-in* de 2, 12 y 18 meses. A) Fragmento de la membrana con las bandas correspondientes a luciferasa, GFP y β -actina. B) Cuantificación relativa de la expresión de luciferasa. C) Cuantificación relativa de la expresión de GFP.

Dada la expresión de GFP/luciferasa detectada en bazo y la carencia de información al respecto en la literatura, sería interesante ahondar en la expresión de IRS2 en este tejido. En el futuro se planean realizar determinaciones de inmunofluorescencia en cortes de tejido de bazo para localizar en qué estructuras tisulares se expresan las proteínas reporteras y así contribuir a esclarecer la función de IRS2 en el bazo.

5. Conclusiones

La caracterización del modelo murino reportero *IRS2/luciferasa/GFP* ha podido llevarse a cabo mediante *western blot* y citometría de flujo. Concretamente, con los resultados obtenidos se puede concluir que:

1. Ambas proteínas reporteras insertadas en el ratón pueden ser detectadas mediante el uso de diversas técnicas.
2. La expresión de GFP, y por tanto de IRS2, aumenta con la edad en islotes de ratones hembra *knock-in*.
3. Las células GFP-positivas de islotes, que expresan IRS2, presentan una menor tasa de proliferación que las células que no expresan IRS2.
4. La técnica FACS ofrece las características técnicas necesarias para separar las células GFP-positivas y GFP-negativas, aunque todavía hay que determinar las condiciones técnicas óptimas.
5. La expresión de luciferasa y GFP, y por tanto de IRS2, aumenta con la edad en el bazo de ratones hembra *knock-in*.

Considerando globalmente los resultados obtenidos, se propone ahondar en los mecanismos celulares gobernados por IRS2 que intervienen en la diferenciación y proliferación de las células de los islotes. Asimismo, resultaría interesante profundizar en el papel de IRS2 en el bazo, dada la relativamente elevada expresión detectada y la escasa información de que se dispone en la literatura científica sobre los mecanismos en los que IRS2 podría estar implicada en dicho órgano.

6. Referencias bibliográficas

- AGENCIA ESPAÑOLA DE SEGURIDAD ALIMENTARIA Y NUTRICIÓN. (2020, 1 octubre). *Estrategia NAOS*. Aesan - Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/nutricion/seccion/estrategia_naos.htm
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. (2011). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 35(Supplement_1), S64-S71. <https://doi.org/10.2337/dc12-s064>
- AZAD, T., TASHAKOR, A., & HOSSEINKHANI, S. (2014). Split-luciferase complementary assay: applications, recent developments, and future perspectives. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(23), 5541–5560. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7980-8>
- BIO TEK. (2001, 20 febrero). *Excitation and Emission of Green Fluorescent Proteins*. Bio Tek - Resources - Technical Notes. <https://www.biotek.com/resources/technical-notes/excitation-and-emission-of-green-fluorescent-proteins/>
- BRERETON, M. F., VERGARI, E., ZHANG, Q., & CLARK, A. (2015). Alpha-, Delta- and PP-cells. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 63(8), 575–591. <https://doi.org/10.1369/0022155415583535>
- BURKS, D. J., & WHITE, M. F. (2001). IRS proteins and beta-cell function. *Diabetes*, 50(Supplement 1), S140-S145. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.2007.s140>
- CHIEFARI, E., ARCIDIACONO, B., FOTI, D., & BRUNETTI, A. (2017). Gestational diabetes mellitus: an updated overview. *Journal of Endocrinological Investigation*, 40(9), 899–909. <https://doi.org/10.1007/s40618-016-0607-5>
- COUSTAN, D. R. (2013). Gestational Diabetes Mellitus. *Clinical Chemistry*, 59(9), 1310–1321. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.203331>
- DOLENŠEK, J., RUPNIK, M. S., & STOŽER, A. (2015). Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas. *Islets*, 7(1), e1024405. <https://doi.org/10.1080/19382014.2015.1024405>
- ENSEMBL. (2021, mayo). *Transcript: Irs2-201*. https://www.ensembl.org/Mus_musculus/Transcript/Exons?db=core;g=ENSMUSG00000038894;r=8:11034681-11058458;t=ENSMUST00000040514
- EVANS, J. L., & GOLDFINE, I. D. (2013). Aging and Insulin Resistance: Just Say iNOS. *Diabetes*, 62(2), 346–348. <https://doi.org/10.2337/db12-1239>
- GONZALEZ, A., MERINO, B., MARROQUÍ, L., ÑECO, P., ALONSO-MAGDALENA, P., CABALLERO-GARRIDO, E., VIEIRA, E., SORIANO, S., GOMIS, R., NADAL, A., & QUESADA, I. (2013). Insulin Hypersecretion in Islets From Diet-Induced Hyperinsulinemic Obese Female Mice Is Associated With Several Functional Adaptations in Individual β -Cells. *Endocrinology*, 154(10), 3515–3524. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1424>
- GRIFFETH, R. J., CARRETERO, J., & BURKS, D. J. (2013). Insulin Receptor Substrate 2 Is Required for Testicular Development. *PLoS ONE*, 8(5), e62103. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062103>

- GUTHRIE, R. A., & GUTHRIE, D. W. (2004). Pathophysiology of Diabetes Mellitus. *Critical Care Nursing Quarterly*, 27(2), 113–125. <https://doi.org/10.1097/00002727-200404000-00003>
- INT'VELD, P. & MARICHAL, M. (2010). Microscopic Anatomy of the Human Islet of Langerhans, en: *The islets of Langerhan*. Springer. Londres: 1-19.
- LEBOVITZ, H. (2001). Insulin resistance: definition and consequences. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 109(Suppl 2), S135-S148. <https://doi.org/10.1055/s-2001-18576>
- LEUNG, P. S. (2010). Overview of the Pancreas, en: *The Renin-Angiotensin System: Current Research Progress in The Pancreas*. Springer. Londres: 3-12.
- LEUNG, P. S. (2010). Physiology of the Pancreas, en: *The Renin-Angiotensin System: Current Research Progress in The Pancreas*. Springer. Londres: 13-27.
- LIM, E. L., HOLLINGSWORTH, K. G., ARIBISALA, B. S., CHEN, M. J., MATHERS, J. C., & TAYLOR, R. (2011). Reversal of type 2 diabetes: normalisation of beta cell function in association with decreased pancreas and liver triacylglycerol. *Diabetologia*, 54(10), 2506–2514. <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2204-7>
- LIPTÁK, N., BŐSZE, Z., & HIRIPI, L. (2019). GFP transgenic animals in biomedical research: a review of potential disadvantages. *Physiological Research*, 525–530. <https://doi.org/10.33549/physiolres.934227>
- MACHADO-NETO, J. A., DE MELO CAMPOS, P., & TRAINA, F. (2016, mayo). *IRS2 (insulin receptor substrate 2)*. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_IRS2.html
- MANZANO-NÚÑEZ, F., ARÁMBUL-ANTHONY, M. J., GALÁN ALBIÑANA, A., LEAL TASSIAS, A., ACOSTA UMANZOR, C., BORREDA GASCÓ, I., HERRERA, A., FORTEZA VILA, J., BURKS, D. J., & NOON, L. A. (2019). Insulin resistance disrupts epithelial repair and niche-progenitor Fgf signaling during chronic liver injury. *PLOS Biology*, 17(1), e2006972. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2006972>
- MARDILOVICH, K., PANKRATZ, S. L., & SHAW, L. M. (2009). Expression and function of the insulin receptor substrate proteins in cancer. *Cell Communication and Signaling*, 7(1), 14. <https://doi.org/10.1186/1478-811x-7-14>
- MEGÍAS, M. P. M. (2020, 20 enero). *Órganos animales. Sistema Linfático. Bazo*. Atlas de histología vegetal y animal. <https://mmegias.webs.uvigo.es/2-organos-a/imagenes-grandes/linfatico-bazo.php>
- MEGÍAS, M. P. M. (2021, 12 mayo). *Tejidos animales. Epitelios Glandulares. Páncreas*. Atlas de histología vegetal y animal. https://mmegias.webs.uvigo.es/a-imagenes-grandes/epitelio_glandula_pancreas.php#n
- NATIONAL DIABETES INFORMATION CLEARINGHOUSE. (2008, octubre). *Diabetes Prevention Program (DPP)*. NIH Publication. <https://dta0yqvfnsiq.cloudfront.net/balancedwellnessky/2017/07/DPP-508-597263bed1e23.pdf>

- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. (2016). *Informe Mundial Sobre la Diabetes - Resumen de Orientación*.
<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254649/9789243565255-spa.pdf;jsessionid=0219A42D7E66F7AF9614A9FE178484A9?sequence=1>
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. (2021, 13 abril). *Diabetes*.
<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>
- POHER, A. L., TSCHÖP, M. H., & MÜLLER, T. D. (2018). Ghrelin regulation of glucose metabolism. *Peptides*, *100*, 236–242. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.12.015>
- PROSHCHINA, A. E., KRIVOVA, Y. S., BARABANOV, V. M., & SAVELIEV, S. V. (2019). Pancreatic endocrine cell arrangement during human ontogeny. *Acta Histochemica*, *121*(5), 638–645. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2019.05.010>
- ROJO-MARTÍNEZ, G., VALDÉS, S., SORIGUER, F., VENDRELL, J., URRUTIA, I., PÉREZ, V., ORTEGA, E., OCÓN, P., MONTANYA, E., MENÉNDEZ, E., LAGO-SAMPEDRO, A., GONZÁLEZ-FRUTOS, T., GOMIS, R., GODAY, A., GARCÍA-SERRANO, S., GARCÍA-ESCOBAR, E., GALÁN-GARCÍA, J. L., CASTELL, C., BADÍA-GUILLÉN, R., . . . CALLE-PASCUAL, A. (2020). Incidence of diabetes mellitus in Spain as results of the nation-wide cohort di@bet.es study. *Scientific Reports*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59643-7>
- SACHDEVA, M. M., & STOFFERS, D. A. (2009). Minireview: Meeting the Demand for Insulin: Molecular Mechanisms of Adaptive Postnatal β -Cell Mass Expansion. *Molecular Endocrinology*, *23*(6), 747–758. <https://doi.org/10.1210/me.2008-0400>
- SCHMIDT, A. M. (2018). Highlighting Diabetes Mellitus. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *38*(1). <https://doi.org/10.1161/atvbaha.117.310221>
- SCHUBERT, M., BRAZIL, D. P., BURKS, D. J., KUSHNER, J. A., YE, J., FLINT, C. L., FARHANG-FALLAH, J., DIKKES, P., WAROT, X. M., RIO, C., CORFAS, G., & WHITE, M. F. (2003). Insulin Receptor Substrate-2 Deficiency Impairs Brain Growth and Promotes Tau Phosphorylation. *The Journal of Neuroscience*, *23*(18), 7084–7092. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-18-07084.2003>
- STEINIGER, B. S. (2015). Human spleen microanatomy: why mice do not suffice. *Immunology*, *145*(3), 334–346. <https://doi.org/10.1111/imm.12469>
- TANIGUCHI, C. M., EMANUELLI, B., & KAHN, C. R. (2006). Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *7*(2), 85–96. <https://doi.org/10.1038/nrm1837>
- THE HUMAN PROTEIN ATLAS. (s. f.). *IRS2*.
<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000185950-IRS2/tissue>
- THE HUMAN PROTEIN ATLAS. (s. f.). *Cell type atlas - IRS2*.
<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000185950-IRS2/celltype>
- WHITE, M. F. (2002). IRS proteins and the common path to diabetes. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *283*(3), E413-E422. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00514.2001>

WITHERS, D. J., BURKS, D. J., TOWERY, H. H., ALTAMURO, S. L., FLINT, C. L., & WHITE, M. F. (1999). Irs-2 coordinates Igf-1 receptor-mediated β -cell development and peripheral insulin signalling. *Nature Genetics*, 23(1), 32–40. <https://doi.org/10.1038/12631>

WITHERS, D. J., GUTIERREZ, J. S., TOWERY, H., BURKS, D. J., REN, J. M., PREVIS, S., ZHANG, Y., BERNAL, D., PONS, S., SHULMAN, G. I., BONNER-WEIR, S., & WHITE, M. F. (1998). Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature*, 391(6670), 900–904. <https://doi.org/10.1038/36116>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2010, 8 diciembre). *Diabetes Data and statistics*. <https://www.euro.who.int/en/health-topics/noncommunicable-diseases/diabetes/data-and-statistics>

ZHUO, M. Q., PAN, Y. X., WU, K., XU, Y. H., ZHANG, L. H., & LUO, Z. (2016). IRS1 and IRS2: molecular characterization, tissue expression and transcriptional regulation by insulin in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 43(2), 619–630. <https://doi.org/10.1007/s10695-016-0316-1>