



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

IMPLICACIÓN DE *KCTD15* EN LA SECRECIÓN DE INSULINA EN CÉLULAS INS1 (832/13)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGICO

PRESENTA

JORGE CANO TÉLLEZ



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente: Dra. Rosario Adelaida Muñoz Clares

Vocal: Dra. Ruth Gutiérrez Aguilar

Secretario: Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra

1er. Suplente: Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova

2° suplente: Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar

Sitio donde se desarrolló el tema:

División de Investigación, Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México.

Laboratorio de Enfermedades Metabólicas: Obesidad y Diabetes, Hospital Infantil de México "Federico Gómez" (HIMFG).

Dra. Ruth Gutiérrez Aguilar

Asesor del tema

Jorge Cano Téllez

Sustentante

Índice

Página

Abreviaturas	
Índice de figuras	
Índice de tablas	
1. Resumen	1
2. Antecedentes	2
2.1 Obesidad: un problema de salud pública	2
2.2 Comorbilidades de la obesidad	3
2.3 Genética de la obesidad	4
2.4 KCTD15	5
2.4.1 El gen KCTD15	5
2.4.2 La proteína KCTD15	6
2.4.3 Probables funciones de KCTD15	7
2.4.4 Expresión de KCTD15 en diferentes tejidos de humanos y de ratas	10
2.4.5 Regulación de la expresión de KCTD15 por dieta alta en grasas y ayuno	10
2.4.6 Relación entre cerebro e islotes pancreáticos	12
2.5 Secreción de insulina	12
3. Planteamiento del problema	15
4. Hipótesis	16
5. Objetivos	16
5.1 Objetivo general	16
5.2 Objetivos particulares	16
6. Materiales y métodos	16
6.1 Cultivo celular	16
6.2 Conteo celular	17
6.3 Transfección de RNA de interferencia pequeño (siRNA)	17
6.4 Extracción de RNA	18
6.5 Cuantificación espectrofotométrica de RNA	19
6.6 Electroforesis en gel de agarosa	20
6.7 Reacción de transcriptasa reversa (RT)	20
6.8 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)	22
6.9 Secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS)	23
6.10 Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)	24
7. Resultados	25
7.1 Optimización de la extracción del RNA y su integridad	25
7.2 Optimización de diferentes concentraciones de la sonda y cDNA para amplificar el transcrito de KCTD15 en las células INS1 (832/13)	25
7.3 Optimización de la concentración de siRNAs y del tiempo de transfección para el silenciamiento parcial de KCTD15	27
7.4 Expresión de KCTD15 en condiciones de baja y alta concentración de glucosa	33
7.5 Efecto del silenciamiento parcial de KCTD15 sobre la secreción de insulina en células INS1 (832/13)	34

8. Discusión	36
9. Conclusión	40
10. Perspectivas	40
11. Referencias	41

Abreviaturas

Abreviatura	Significado
AT	Agente de transfección
ATP	Adenosina trifosfato
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
GSIS	Secreción de insulina estimulada por glucosa
GWAS	Estudios de asociación del genoma completo
h	Hora
HOMA-IR	Evaluación del modelo de homeostasis de la resistencia a la insulina
IMC	Índice de masa corporal
K_{ATP}	Canal de potasio dependiente de ATP
K_v	Canal de potasio dependiente de voltaje
KCTD15	Dominio 15 de tetramerización que contiene el canal de potasio
MES	Ácido-2-(N-morfolino)-etanosulfónico
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
PBS	Regulador de pH de sales de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RI	Resistencia a la insulina
RPMI	Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute
RT	Reacción de la transcriptasa reversa
RNA	Ácido ribonucleico
SFB	Suero fetal bovino
siC	siRNA Control
siK	siRNA <i>KCTD15</i>
siRNA	Ácido ribonucleico de interferencia pequeño
TAE	Tris-acetato EDTA
TMB	3,3',5,5'-tetrametil-benzidina

Índice de figuras

	Página
Figura 1. Estructura intrón/exón del gen <i>KCTD15</i>	5
Figura 2. Familia de las 25 proteínas KCTD.	7
Figura 3. Actividades hipotéticas de <i>KCTD15</i> , como posible factor transcripcional, mediadas por AP-2 α en el desarrollo de la cresta neural y adipogénesis.	9
Figura 4. Regulación de <i>KCTD15</i> por dieta y ayuno en tejido adiposo e hipotálamo de ratas.	11
Figura 5. Esquema de la secreción de insulina en células β pancreáticas.	14
Figura 6. RNA extraído visualizado en un gel de agarosa.	25
Figura 7. Gráfica de amplificación del gen <i>KCTD15</i> en células INS1 (832/13).	27
Figura 8. Fenotipo y morfología de las células INS1 (832/13) después del silenciamiento parcial de <i>KCTD15</i> , con diferentes concentraciones de <i>siK</i> , a las 72 h post-transfección.	29
Figura 9. Porcentaje del silenciamiento parcial de <i>KCTD15</i> al optimizar diferentes concentraciones del siRNA a las 72 horas post-transfección de células INS1 (832/13).	31
Figura 10. Porcentaje del silenciamiento parcial de <i>KCTD15</i> a las 24, 48 y 72 horas post-transfección.	31
Figura 11. Porcentaje de expresión relativa de <i>KCTD15</i> a las 72 horas post-transfección.	32
Figura 12. Efecto del silenciamiento parcial de <i>KCTD15</i> en el número de células INS1 (832/13).	33
Figura 13. Porcentaje de expresión relativa de <i>KCTD15</i> en presencia de estímulos de D-Glucosa.	34
Figura 14. Efecto del silenciamiento parcial de <i>KCTD15</i> en la secreción de insulina en las células INS1 (832/13).	35

Índice de tablas

	Página
Tabla 1. Clasificación del estado nutricional en adultos de acuerdo con el índice de masa corporal.	2
Tabla 2. Reactivos para la reacción de transcriptasa reversa (RT).	21
Tabla 3. Condiciones para la reacción de transcriptasa reversa (RT).	21
Tabla 4. Reactivos para la reacción de qPCR.	22
Tabla 5. Perfil térmico de qPCR.	23
Tabla 6. Valores Ct de optimización de sonda y cDNA para ensayos de qPCR.	26

1. Resumen

KCTD15 es un gen asociado a la obesidad y a la resistencia a la insulina, el cual fue descubierto mediante estudios de asociación del genoma completo. Se ha demostrado que *KCTD15* se expresa en el hipotálamo, un importante centro de regulación de la homeostasis energética y de la glucosa.

Un estudio en ratas mostró que la expresión de *KCTD15* en el hipotálamo disminuye al someter a los animales ante una dieta alta en grasas y ayuno. Esto sugiere que el gen pudiera estar involucrado en la regulación de energía e ingesta de alimentos, así como la regulación de la homeostasis a la glucosa. Se ha propuesto que *KCTD15* pudiera ser un factor transcripcional inhibitorio de la formación de la cresta neural y de la supresión de adipogénesis. También, *KCTD15* se propone como un canal de potasio, por lo que pudiera estar involucrado en la secreción de insulina. Sin embargo, poco se conoce de la función de *KCTD15*, tanto en la homeostasis energética, como en la homeostasis de la glucosa.

En este trabajo, se estudió la presencia de *KCTD15* en células pancreáticas, su expresión en presencia de diferentes concentraciones de glucosa y su implicación en la secreción de insulina. Para esto, se utilizó el modelo celular INS1 (832/13), donde se suprimió la expresión de *KCTD15* mediante una transfección transitoria de 72 horas. Se observó que al silenciar al gen *KCTD15* no hay diferencias en la confluencia celular. Al estimular a las células con diferentes concentraciones de D-glucosa (0, 3 y 15 mM), la expresión de *KCTD15* aumenta conforme a la concentración de glucosa. Sin embargo, en las células donde se silenció parcialmente a *KCTD15*, los estímulos de glucosa no provocaron ningún cambio en la expresión del transcrito de *KCTD15*.

Por otra parte, se observó que *KCTD15* no está implicado en la secreción de insulina, ya que no se observó diferencia entre las células en presencia o ausencia de *KCTD15*. *KCTD15* no modifica la secreción de insulina en células INS1 (832/13), pero su transcrito sí está regulado por estímulos de glucosa, así como por dieta alta en grasas y ayuno, reportado anteriormente. Esto sugiere que *KCTD15* está involucrado en la regulación energética y su mecanismo es aún desconocido.

2. Antecedentes

2.1 Obesidad: un problema de salud pública

La obesidad es el resultado del desbalance sostenido entre la ingesta de calorías y el gasto calórico. Esta enfermedad involucra factores genéticos (mutaciones o variantes genéticas), así como factores ambientales (baja actividad física, gran ingesta de alimento, etc.) (WHO, 2018). La obesidad se caracteriza por un balance positivo de la balanza energética, que ocurre cuando la ingesta de calorías excede al gasto energético, ocasionando un aumento en los depósitos de grasa corporal y, por ende, ganancia de peso (Bray, 1999).

La definición de obesidad, según la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Consejo de Salubridad General, corresponde a la presencia de un índice de masa corporal, $IMC > 30 \text{ kg} / \text{m}^2$ (IMSS, 2009). La Tabla 1 muestra el sistema de cálculo y la clasificación de sobrepeso y obesidad según el IMC de la OMS:

$$IMC = \frac{\textit{peso (kg)}}{\textit{estatura - en metros - al cuadrado (m}^2\textit{)}}$$

Tabla 1. Clasificación del estado nutricional en adultos de acuerdo con el índice de masa corporal*

Clasificación	IMC (kg/m²)	Riesgo de comorbilidades
Bajo peso	< 18.5	Bajo (con riesgo elevado de otros problemas clínicos)
Normal	18.5-24.9	Promedio
Sobrepeso	25.0-29.9	Incrementado
Obesidad clase I	30.0-34.9	Moderado
Obesidad clase II	35.0-39.9	Severo
Obesidad clase III	≥ 40.0	Muy severo

*Tomado y modificado de WHO, 1998.

La prevalencia mundial, estimada en 2015, señala que al menos una de cada tres personas en el mundo padece sobrepeso u obesidad (Afshin et al., 2017).

En México, datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018 (ENSANUT) señalan que la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad en niños de 0 a 4 años es de 8.2%, en niños de 5 a 11 años es de 35.6% y en adolescentes de 12 a 19 años es de 38.4%. En particular, la prevalencia de sobrepeso y obesidad en adultos (población mayor a 20 años de edad) es del 75.2%, por lo que 7 de cada 10 personas sufren de esta enfermedad (ENSANUT, 2018). La prevalencia de la obesidad y sus comorbilidades asociadas son un serio problema de salud pública en México, no sólo porque se afecta la calidad de vida, sino también porque involucra importantes gastos económicos (Rtveladze et al., 2014).

2.2 Comorbilidades de la obesidad

Algunas comorbilidades de la obesidad son el síndrome metabólico y la diabetes mellitus tipo 2 (DM2).

El síndrome metabólico se caracteriza por: intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina (RI), obesidad, hipertrigliceridemia, niveles séricos bajos de lipoproteínas de alta densidad, hipertensión y aterosclerosis acelerada. Cuando se presenta la RI, el páncreas aún puede producir y secretar insulina; sin embargo, las células blanco de esta hormona son incapaces de responder efectivamente a las concentraciones en sangre, lo que provoca una mayor estimulación de las células beta pancreáticas para producir más insulina, causando así hiperinsulinemia (Andolfi & Fisichella, 2018).

Una hiperinsulinemia sostenida conlleva al agotamiento de las células beta pancreáticas, resultando en DM2 (Velasco-Contreras, 2016). Al cabo de algunos años, esto provoca la ausencia de la secreción de insulina, ya que a mayor duración y complicación de la obesidad, la RI progresa hasta provocar una severa intolerancia a la glucosa, incapaz de ser compensada por las células beta pancreáticas (Boticario & Calvo, 2013). Se ha calculado que por cada kilo de

aumento en peso, hay un 4.5% de mayor riesgo para el desarrollo de DM2 (Ford, Williamson, & Liu, 1997). Se estima que al menos entre el 45 y 80% de las personas que padecen DM2, alguno de sus padres padeció la enfermedad y existen antecedentes familiares y genéticos relacionados con DM2 (Rentería, 2015).

2.3 Genética de la obesidad

La prevalencia de la obesidad va en aumento en todo el mundo y se han descrito varios genes asociados a esta condición, los cuales están involucrados con la regulación de la balanza energética, dada por la ingesta de alimentos y el gasto energético (Ogden, Yanovski, Carroll, & Flegal, 2007). Los hábitos de alimentación o el sedentarismo pueden explicar de manera global el incremento en la prevalencia de la obesidad. Sin embargo, la variación individual del IMC, en relación a los factores hereditarios, influye entre un 40% y 70% sobre la prevalencia de obesidad (Herrera & Lindgren, 2010).

Hace ya una década, los primeros estudios de asociación del genoma completo (GWAS) de la obesidad encontraron 16 *loci* asociados a esta enfermedad (Meyre et al., 2009; Thorleifsson et al., 2009; Willer et al., 2009). En la actualidad, se han identificado hasta 941 variantes de un solo nucleótido (en adelante, referidas como variantes) asociadas a la obesidad (Yengo et al., 2018). Sin embargo, la función de muchos de los genes asociados a la obesidad es aún desconocida.

Uno de estos genes, *KCTD15*, fue asociado genéticamente a la obesidad, mediante un GWAS de variantes provenientes de una cohorte caso-control, de más de 100,000 individuos, de población europea, donde se obtuvo un valor de significancia de $P = 4.5 \times 10^{-12}$ para este gen (Willer et al., 2009). Además, *KCTD15* ha sido asociado con la resistencia a la insulina, mediante la evaluación del modelo de homeostasis de la resistencia a la insulina (HOMA-IR) en una cohorte caso-control de casi 3500 niños chinos (6-18 años). Se demostró que la asociación de *KCTD15* con HOMA-IR fue significativa, $P = 0.034$, OR = 1.15 (1.01-1.31) (Xi et al., 2014), lo cual sugiere su importancia en el metabolismo. Sin embargo, no se conoce aún su función, ni su implicación en la homeostasis energética y de la glucosa.

2.4 KCTD15

2.4.1 El gen *KCTD15*

El gen codificante para el dominio 15 de tetramerización que contiene el canal de potasio (*KCTD15*) se encuentra localizado, en humanos, en el cromosoma 19, en el brazo largo región 1, banda 3, sub-banda 11 (19q13.11). Tiene una longitud de 18902 pb, consta de 7 exones y 6 intrones (University of California Santa Cruz Genomics Institute, 2019). En ratas, se encuentra localizado en el cromosoma 1, en el brazo largo región 2, banda 1 (1q21). Tiene una longitud de 13316 pb, consta de 6 exones y 5 intrones (Figura 1)(University of California Santa Cruz Genomics Institute, 2020).

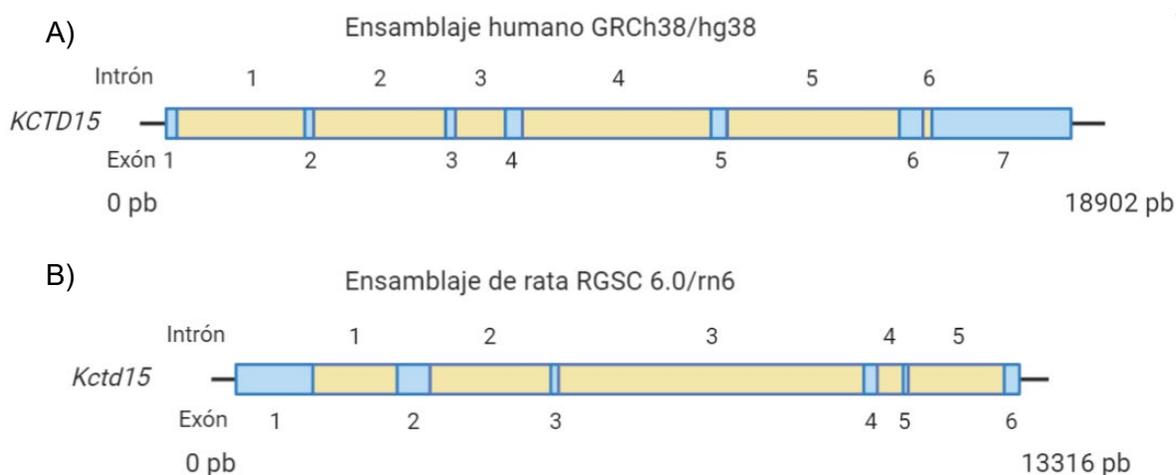


Figura 1. Estructura intrón/exón del gen *KCTD15*. **A)** El gen *KCTD15* (humano), conformado por 18902 pares de bases, 7 exones (azul) y 6 intrones (amarillo). **B)** El gen *Kctd15* (rata), conformado por 13316 pares de bases, 6 exones (azul) y 5 intrones (amarillo).

El gen *KCTD15* se expresa en tejido adiposo, médula espinal, córtex cerebral, ectocérvix, hipocampo, piel, riñón, colon, músculo esquelético, bazo,

ovario, testículo, páncreas; se ha reportado, se expresa desde la semana 10 post-concepción hasta en jóvenes adultos (EMBL-EBI, 2020). Además, durante el desarrollo embrionario, interfiere con la formación de la cresta neural, e inhibe la actividad transcripcional de AP2 al interactuar con su dominio de activación (Swiss-Prot, 2020).

2.4.2 La proteína KCTD15

KCTD15 codifica una proteína que pertenece a una familia con 25 miembros llamada dominio de tetramerización que contiene el canal de potasio (KCTD) y se esquematizan en la Figura 2 (Skoblov et al., 2013). Tanto la proteína KCTD15 humana, como la de rata, consta de 283 aminoácidos y de una masa molecular de 31942 Da (Swiss-Prot, 2020; UniProtKB, 2020).

Los miembros de la familia KCTD comparten un dominio N-terminal común. Este dominio se denomina BTB (Complejo Amplio, Tramtrac y Bric-a-brac) / POZ (poxovirus y dedo de zinc), que es el mayor motivo de interacción proteína-proteína, encontrado en virus y en todos los eucariontes (Perez-Torrado, Yamada, & Defosse, 2006) y el cual determina la localización de proteínas dentro de las células. Además, poseen una alta variabilidad en sus regiones C-terminales, las cuales determinan la interacción proteína-proteína y por ende, la función de cada miembro de la familia KCTD (Skoblov et al., 2013; Teng et al., 2019). Estructuralmente, el modelo de KCTD15 señala que es un homo-pentámero, debido al dominio BTB/POZ, y sin ligandos (Schwede, 2020). KCTD15 es una proteína intracelular, localizada en el nucleoplasma y el aparato de Golgi (The Human Protein Atlas, 2020).

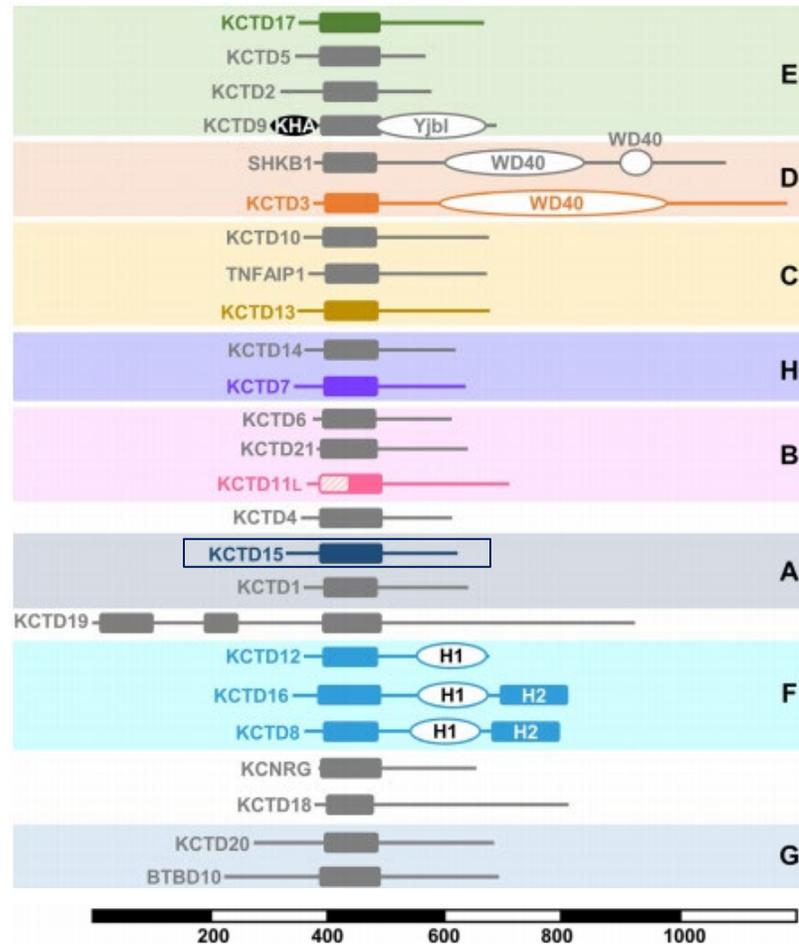


Figura 2. Familia de las 25 proteínas KCTD. Los rectángulos alineados indican el dominio BTB. La barra de escala indica la longitud de la proteína en residuos de aminoácidos. Tomado y modificado de Teng *et al.*, 2019.

2.4.3 Probables funciones de KCTD15

Hasta el momento se desconoce la función específica de KCTD15 y su implicación en el metabolismo. Sin embargo, se propuso que KCTD15 pudiera ser un factor transcripcional, ya que pertenece al mismo clado que KCTD1, el cual es un factor transcripcional (Figura 2) (Skoblov *et al.*, 2013). Las secuencias de KCTD15 y KCTD1 tienen una homología del 79% (Pirone *et al.*, 2019).

En 2008, se reportó por primera vez la descripción del gen KCTD1 (Ding *et al.*, 2008). Posteriormente, se describió la función de KCTD1, donde se demostró

que actúa reprimiendo transcripcionalmente a AP-2 α uniéndose a *TFAP2A* y *TFAP2B*, lo cual resultó importante, puesto que otras proteínas con dominio BTB no pueden inhibir a AP-2 α (Ding et al., 2009), aunque todavía se desconoce mucho de su función.

Sin embargo, el primer reporte de KCTD15 fue en el año 2009, donde se demostró su asociación genética a la obesidad (Willer et al., 2009), sin saber su función. Debido a la gran homología de KCTD15 con KCTD1, se evaluó si KCTD15 también poseía la misma función que KCTD1, y ahora se sabe que KCTD15 inhibe la expresión de AP-2 α (proteína activadora 2-alfa) (Zarelli & Dawid, 2013), la cual es un factor de activación que regula la transcripción de genes relacionados al desarrollo embrionario y diferenciación celular (Eckert, Buhl, Weber, Jäger, & Schorle, 2005).

Existen pocos artículos donde se describa la función de KCTD15 y su relación con el metabolismo. En la figura 3, se describe el posible mecanismo por el cual KCTD15 regula la adipogénesis (Skoblov et al., 2013). Se demostró que KCTD15 reprime a AP-2 α , lo que a su vez, inhibe la actividad de C/EBP α (Jiang et al., 1998), reduciendo la inducción de adipogénesis. Por otra parte, la represión de KCTD15 sobre AP-2 α también afecta la vía de señalización Wnt/beta-catenina (Gharbi, Zhao, Ellingsen, & Fjose, 2012; Skoblov et al., 2013), la cual regula a la cresta neural, lo que dará origen al linaje mesenquimal y este a su vez a los adipocitos (Clevers & Nusse, 2012; MacDonald, Tamai, & He, 2009).

Por otra parte, se ha reportado que KCTD15 tiene interacción con la proteína reguladora de la adipogénesis GRP78 (Smaldone et al., 2018), y el silenciamiento de *KCTD15* inhibe la diferenciación de adipocitos y acumulación de lípidos (Jing Xu et al., 2020). Además, ensayos realizados con *Xenopus* demostraron que KCTD15 es reprimido por la vía del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (Takahashi, Suzuki, Nishida, & Kusakabe, 2012), quien estimula la proliferación de adipocitos y adipogénesis temprana (Widberg et al., 2009).

Lo anterior sugiere que KCTD15 está involucrado en la adipogénesis, con lo cual cobra significado su asociación con la obesidad.

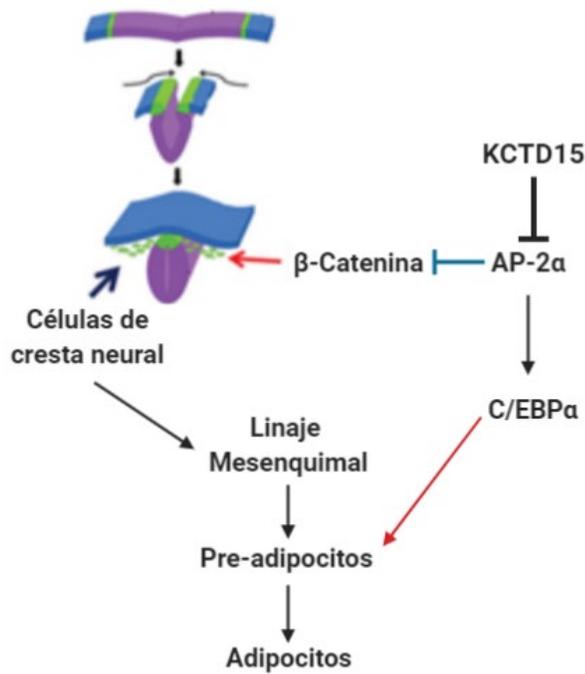


Figura 3. Actividades hipotéticas de KCTD15, como posible factor transcripcional, mediadas por AP-2 α en el desarrollo de la cresta neural y adipogénesis. Figura tomada y modificada de Skoblov et al., 2013.

Por otra parte, se ha sugerido que KCTD15 podría ser un canal de potasio (Orlov, 2019). Esto se debe a que KCTD15 posee el dominio BTB/POZ, que es contenido también por los canales Kv (Bixby et al., 1999; Kelly & Daniel, 2006).

Se ha propuesto que KCTD15 podría interferir en el ensamblaje normal de los canales de potasio Kv (Skoblov et al., 2013). Esto se observó anteriormente con otro miembro de la familia KCTD, la proteína KCNRG, la cual suprime las corrientes de potasio, K⁺ (Ivanov et al., 2003) y lo hace por medio de su interacción con los canales Kv1.1 y Kv1.4 (Usman & Mathew, 2010). Sin embargo, el modelaje de la proteína KCTD15 sugiere una ausencia de regiones transmembranales, pero se encontraron dominios de unión (BTB/POX) a otras proteínas (Kv1.2) y plegamientos que se presentan en factores transcripcionales (comunicación personal de la Dra. Liliana Moreno).

No obstante, los mecanismos moleculares y la función de la proteína *KCTD15* permanecen inciertos, proponiéndose que podría ser un factor transcripcional o un canal de potasio (Orlov, 2019; Teng et al., 2019).

2.4.4 Expresión de *KCTD15* en diferentes tejidos de humanos y de ratas

Con el interés de encontrar la desconocida función de *KCTD15* y su posible implicación en la obesidad y resistencia a insulina, se comenzó analizando los órganos involucrados en el metabolismo y donde este gen pudiera expresarse. Se había reportado que *KCTD15* se expresa en diferentes tejidos en humanos como: en pulmones, hipotálamo, cerebro, corazón, adipocitos, bazo, riñones, testículos, hígado, páncreas y músculo (Willer et al., 2009). Por otra parte, se encontró que la expresión de *KCTD15* en ratas es mayor en el hipotálamo, seguido por el tejido adiposo, el músculo soleo, músculo extensor largo de los dedos e hígado (Gutiérrez-Aguilar et al. 2012).

2.4.5 Regulación de la expresión de *KCTD15* por dieta alta en grasas y ayuno

Se observó que, en las ratas sometidas a una dieta alta en grasas, ocurre una reducción en la expresión de *KCTD15* en el hipotálamo y en el tejido adiposo, comparadas con ratas sometidas a una dieta normal (Figura 4a) (Gutiérrez-Aguilar et al., 2012). Estos mismos resultados se obtuvieron en ratones sometidos a una dieta alta en grasas y sacarosa en comparación con una dieta normal (Yoganathan, Karunakaran, Ho, & Clee, 2012).

En otro experimento, se comparó la expresión relativa hipotalámica de los genes *KCTD15*, neuropéptido Y (*NPY*) y pro-opiomelacortina (*POMC*) de ratas en ayuno por 48 h y ratas alimentadas 2 h antes del sacrificio. Se observó que *KCTD15* mostró una reducción en la expresión del transcrito (Figura 4b), al igual que *POMC*,

en condiciones de ayuno comparada a la condición postprandial. Sin embargo, *NPY* aumentó su expresión relativa en estado de ayuno, contrario a *POMC* y *KCTD15* (Gutierrez-Aguilar et al., 2012). Por lo tanto, la expresión de *KCTD15* se encuentra regulada por dieta alta en grasas y ayuno, lo que sugiere que *KCTD15* podría servir como un regulador de la carga energética presente en el hipotálamo.

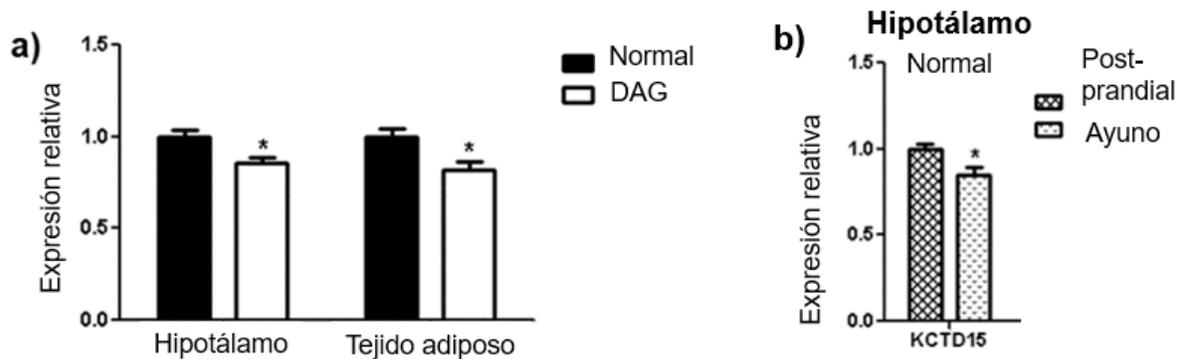


Figura 4. Regulación de *KCTD15* por dieta y ayuno en tejido adiposo e hipotálamo de ratas. a) La expresión relativa de *KCTD15*, tanto en hipotálamo como en tejido adiposo, se ve reducida en ratas sometidas a una dieta alta en grasas, en comparación con una dieta normal. b) En el hipotálamo de ratas, la expresión relativa de *KCTD15* disminuye en un estado de ayuno. Tomado y modificado de Gutierrez-Aguilar et al. 2012.

Se sabe que las neuronas hipotalámicas que expresan *POMC* envían señales anoréxicas, las cuales reducen la ingesta de comida y aumentan el gasto de energía (Morton, Cummings, Baskin, Barsh, & Schwartz, 2006; Schwartz, Woods, Porte, Seeley, & Baskin, 2000). Además, se ha reportado que las neuronas hipotalámicas AgRP, las cuales tienen alta expresión de *NPY*, son responsables de inducir la señalización para aumentar la ingesta de comida (Aponte, Atasoy, & Sternson, 2011). Por lo tanto, *KCTD15* podría tener un efecto anorexigénico al modular su expresión de manera similar a *POMC*. Además, se observó que la expresión de *KCTD15* es modulada por la carga energética (ayuno o dieta).

2.4.6 Relación entre cerebro e islotes pancreáticos

El cerebro y los islotes pancreáticos están estrechamente relacionados funcionalmente, a pesar de que no comparten un origen de desarrollo en común. Estos dos órganos comparten muchas vías bioquímicas, y por lo tanto, se caracterizan por una amplia superposición en la expresión génica y función de proteínas expresadas en los dos órganos (Schwartz, Guyenet, & Cirulli, 2010).

Además, se sabe que la insulina regula la balanza energética al existir receptores de insulina en varios núcleos hipotalámicos, entre ellos en el núcleo arqueado (Houten, Posner, Kopriwa, & Brawer, 1979), donde existen neuronas POMC y NPY/AgRP. Por lo tanto, el páncreas y el cerebro están involucrados en la regulación energética y en la homeostasis de la glucosa.

Se ha descrito que muchos de los genes asociados a la obesidad están altamente expresados en el hipotálamo, por lo que pudieran tener un rol importante en los procesos de regulación de la balanza energética y en la homeostasis de la glucosa (Willer et al., 2009).

Al estar *KCTD15* expresado en el hipotálamo y que su expresión esté regulada por dieta o por ayuno, esto sugiere que este gen pudiera tener una función en la regulación energética y en la homeostasis de la glucosa. Por lo tanto, es posible que este gen se exprese también en el páncreas y que regule la secreción de insulina.

2.5 Secreción de insulina

La homeostasis de la glucosa en el cuerpo recae principalmente en la habilidad de las células β -pancreáticas de regular la secreción de insulina, en respuesta a los cambios de concentración de glucosa en sangre (Han et al., 2018). La insulina es la hormona que disminuye la concentración plasmática de glucosa y es liberada según se requiera.

Fisiológicamente, un aumento de la glucosa desencadena la secreción de insulina que consiste en dos fases (Figura 5); la primera es una secreción rápida de entre 5 y hasta 10 minutos después del estímulo, donde se liberan los gránulos de insulina preanclados en membrana plasmática mediante fusión (Curry, Bennet, & Grodsky, 1968; Rorsman & Renstrom, 2003). Cuando la primera fase se desajusta, es un distintivo patológico de los primeros estadios de la DM2 en sujetos en riesgo de padecerla (Brunzell et al., 1976).

La segunda fase consiste en una secreción de insulina más sostenida, que dura entre 5 a 15 minutos después de la estimulación con glucosa, correspondiente con los gránulos de insulina que van llegando desde citoplasma, se anclan y fusionan con la membrana plasmática. Todo esto se debe a un aumento en la actividad eléctrica de la célula beta pancreática (Gaisano, 2014; Rorsman & Renstrom, 2003).

La glucosa entra a la célula β -pancreática mediante los receptores GLUT2 (Röder, Wong, Hong, & Han, 2016). Posteriormente, se fosforila por acción de la enzima glucocinasa, formando glucosa-6-fosfato, y por medio de la glucólisis, ciclo del ácido cítrico y la fosforilación oxidativa generará ATP. El aumento de ATP causa el cierre de los canales K_{ATP} , provocando la despolarización de la membrana plasmática, lo cual activa a los canales de calcio dependientes de voltaje (VDCC) y canales de potasio dependientes de voltaje (Kv). Al activarse estos canales, el calcio entra a la célula, provocando que las vesículas que contienen la insulina, se unan a la membrana celular para favorecer a la exocitosis de la insulina (Figura 5) (Fu et al., 2017; Lang, 1999).

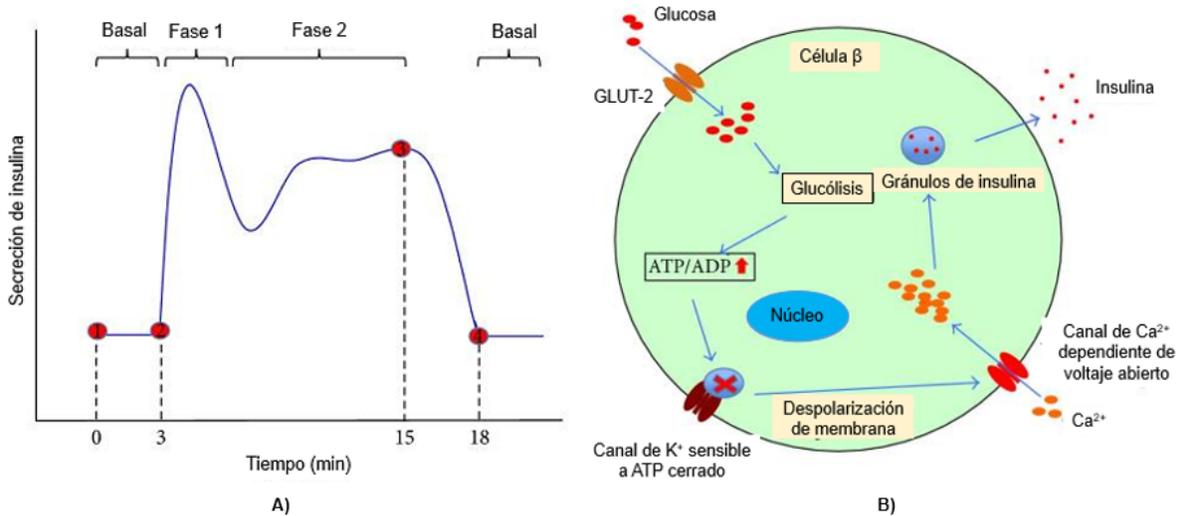


Figura 5. Esquema de la secreción de insulina en células β pancreáticas. A) Gráfica que ilustra la secreción de insulina bifásica. **B)** Representación celular del proceso de secreción de insulina simplificado. Tomado y modificado de Qi 2014.

Se ha reportado que los canales de potasio sensibles a ATP (K_{ATP}) son parte del mecanismo implicado en la secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS). Por otra parte, los canales de potasio son esenciales para el establecimiento de gradientes transmembranales y potenciales de membrana en células excitables y no excitables (Castle, 2010).

Además, se han relacionado a los canales dependientes de voltaje Kv2.1 y Kv2.2 con la exocitosis de gránulos de insulina en células beta pancreáticas (Fu et al., 2017; Jensen et al., 2013). Kv2.1 parece facilitar la exocitosis de los gránulos contenedores de insulina interaccionando con la membrana plasmática, la proteína 1A y con el complejo SNARE; además, de su actividad de repolarización como parte de los canales Kv (Fu et al., 2017). Kv2.2 está ampliamente expresado en páncreas de rata y humano, contribuye en la corriente de repolarización de Kv y actúa como un regulador de Kv2.1 (Jensen et al., 2013).

Otro miembro de la familia Kv, Kv1.3, se ha reportado que regula el peso corporal, la absorción de glucosa, sensibilidad a la insulina y homeostasis de energía (Jianchao Xu, 2003; Jianchao Xu et al., 2004).

Dado que *KCTD15* posee el mismo dominio conservado BTB/POZ presente en los canales Kv (Liang et al., 2015), es posible que *KCTD15* pueda tener funciones similares a los canales dependientes de voltaje y esté implicado en la secreción de insulina.

3. Planteamiento del problema

El gen *KCTD15* está asociado a la obesidad; sin embargo, se desconoce su función. Se postula que *KCTD15* pudiera ser un factor transcripcional o un canal de potasio regulado por voltaje.

En un modelo de obesidad inducida por dieta, se observó que la expresión de *KCTD15* en el hipotálamo disminuye en ratas obesas comparadas contra los controles. Además, se observó que su expresión disminuye bajo condiciones de ayuno, sugiriendo su implicación en la homeostasis energética y de la glucosa.

La insulina es una hormona que responde a los cambios energéticos y de glucosa, y que además los regula, debido a la comunicación páncreas-hipotálamo. Además, los canales de potasio regulados por voltaje son importantes para la repolarización y secreción de péptidos, tanto de neuronas como de las células β pancreáticas. Es por esto, que es de nuestro interés establecer la posible implicación de *KCTD15*, específicamente en la secreción de la insulina. Por dicha razón, se utilizó un modelo celular capaz de secretar insulina (INS1 832/13).

Por lo tanto, se analizó si *KCTD15* se encuentra expresado en la línea celular INS1 (832/13). Posteriormente, se averiguó si el gen *KCTD15* es regulado por diferentes concentraciones de glucosa. Finalmente, se estudió la implicación de este gen en la secreción de insulina.

En general, el presente trabajo pretende dar un acercamiento sobre la función de *KCTD15* en la secreción de insulina de células β -pancreáticas.

4. Hipótesis

El gen *KCTD15* está implicado en la secreción de insulina de las células β -pancreáticas INS1 (832/13).

5. Objetivos

5.1 *Objetivo general*

Determinar la implicación del gen *KCTD15* sobre la secreción de insulina de las células INS1 (832/13).

5.2 *Objetivos particulares*

1. Optimizar la transfección de siRNA contra *KCTD15* en células INS1 (832/13).
2. Determinar el efecto del silenciamiento parcial de *KCTD15* sobre el fenotipo de las células INS1 (832/13).
3. Evaluar el efecto de estímulos de glucosa sobre la expresión de *KCTD15* en las células INS1 (832/13).
4. Determinar el efecto del silenciamiento parcial de *KCTD15* sobre la secreción de insulina de las células INS1 (832/13).

6. Materiales y métodos

6.1 Cultivo celular

Se empleó la línea celular INS1 (832/13), pases 26 a 35. Esta línea celular proviene de células β -pancreáticas de rata (Hohmeier et al., 2000).

Para su cultivo, se empleó el medio de crecimiento RPMI-1640 (Sigma Aldrich®) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (HIFBS,

Gibco®), 10 mM HEPES (Gibco®), 2 mM L-glutamina (Sigma Aldrich ®), 1 mM piruvato de sodio (Sigma Aldrich®), 0.05 mM 2-mercaptoetanol (Sigma Aldrich®), penicilina/estreptomicina 100 U/ mL (Hyclone®). El cultivo se mantuvo a 37°C, 5% CO₂, 95% humedad relativa (HR) con cambios de medio cada 4 días.

6.2 Conteo celular

Los cultivos celulares se mantuvieron hasta una confluencia de 70-80%. Se aspiró el medio y se realizó un lavado con amortiguador de pH de fosfatos salino (PBS). Se incubó con 1 mL de tripsina 0.25 % con rojo fenol (HyClone ®) para cajas de Petri de cultivo celular o 0.5 mL para placas de 6 pozos, a 37°C por 2 minutos.

Con ayuda de una micropipeta, se despegaron mecánicamente las células, seguido de la adición de 1-2 mL de PBS. Las células se colectaron en un tubo cónico de 15 mL y se centrifugaron a 2000 rpm por 3 minutos. Se aspiró el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular en 1 mL de medio completo.

Se prepararon muestras celulares en PBS en una dilución 1:100 (2 diluciones seriales de 90 µL de PBS con 10 µL de la suspensión celular). Se cargaron 10 µL en la cámara de Neubauer. Se contaron las células en tres cuadrantes y se calculó el número de células empleando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Células}}{\mu\text{L}} = \frac{\Sigma \text{ células contadas}}{3 \text{ cuadrantes} * 0.1 \text{ mm grosor} * \text{dilución}}$$

6.3 Transfección de RNA de interferencia pequeño (siRNA)

La interferencia de RNA es una técnica de biología molecular empleada para prevenir la síntesis de proteínas celulares, al degradar su mRNA. Los RNAs de interferencia pequeños (siRNAs) son introducidos dentro de las células usando agentes de transfección comerciales.

La composición de esos reactivos frecuentemente es de lípidos catiónicos o polímeros para facilitar la transferencia de siRNAs negativamente cargados, a través de la membrana plasmática (Özbalci, Storck, & Eggert, 2019).

Para los ensayos de transfección, se colocaron 600,000 células por pozo en placas de 6 pozos, con 2 mL de medio completo y se incubaron por 24 h a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa.

Al día siguiente, se preparó el agente de transfección (AT, DharmaFECT® 1 T-2001-02) 1 µL con 99 µL de medio RPMI-1640 sin suero fetal bovino (SFB) por pozo, mezclando por pipeteo suave y dejando 5 minutos de incubación (Tubo A).

En otro tubo, se pusieron 98 µL de medio RPMI-1640 sin SFB con 2 µL de siRNA Control (siC, Dharmacon® D-001810-10) o siRNA *KCTD15* (siK, Dharmacon® L-104740-02) (concentración final 40 nM por pozo) (Tubo B). El contenido del Tubo A y el Tubo B (200 µL totales por pozo) se mezcló cuidadosamente por inversión y se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el medio completo de los pozos y se adicionaron 1.8 mL de medio completo RPMI-1640 fresco a cada pozo, teniendo especial cuidado de no despegar las células. Posteriormente, se adicionaron 200 µL de la mezcla de A+B por goteo con ayuda de una micropipeta.

6.4 Extracción de RNA

El RNA se extrajo de células INS1 (832/13), empleando el kit de extracción Total RNA Purification Kit (Jena Bioscience®):

Esto consistió en adicionar 500 µL de amortiguador de lisis al paquete celular. El buffer de lisis está compuesto de tiocianato de guanidina (4M), como desnaturante de proteínas; ácido-2-(N-morfolino)-etanosulfónico (MES 10 mM) a pH=5.5, que se une a proteínas y carbohidratos para facilitar su elución en los lavados y β-mercaptoetanol, que es un agente reductor de enlaces disulfuro y desnaturante de ribonucleasas. Posteriormente, se agregaron 350 µL de isopropanol 99.5% puro (Sigma-Aldrich®) a las células, para disminuir la solubilidad

del RNA. Después, se sometieron a agitación por pipeteo y vórtex por 10 segundos para lisar las células.

Por otra parte, la columna de purificación se activó utilizando buffer de activación con el fin de hidratar la sílica contenida en ella, dándole la polaridad positiva necesaria para retener al RNA.

Una vez lisadas las células, se colocaron en la columna de purificación y se centrifugó a 10,000 g por 30 segundos. Se lavaron con 700 μ L de solución de lavado primario y se centrifugaron por 30 segundos, descartando el eluido. Un segundo lavado con 700 μ L de solución de lavado secundario y también otra centrifugación.

Finalmente, se centrifugó a 10,000 g por 2 minutos para eliminar residuos de soluciones de lavado. Se colocó la columna en un nuevo microtubo de 1.5 mL libre de DNAsas/RNAsas y se añadió 30 μ L de agua libre de RNAsas a temperatura ambiente, centrifugando por 30 segundos a 10,000 g, para obtener el eluido que contiene el RNA.

6.5 Cuantificación espectrofotométrica de RNA

La calidad y cantidad de RNA extraído se determinó por espectrofotometría y electroforesis.

La medición espectrofotométrica se realiza en el intervalo del espectro UV, con lecturas a una $\lambda = 260$ y 280 nm. Cuando la relación A_{260}/A_{280} es menor a 1.8, esto es indicador de contaminación con material proteínico. Si es mayor de 1.8, se considera que es una muestra pura de RNA. La concentración de RNA total se basa en la equivalencia (Leland J. Cseke, Ara Kirakosyan, Peter B. Kaufman, 2011):

$$\frac{40 \mu\text{g RNA}}{\text{mL}} = 1.0 \text{ cuando se mide en una celda de 1 cm de longitud}$$

$$\text{RNA total} = A_{260} * 40 \mu\text{g/mL RNA} * \frac{\text{volumen total}}{\mu\text{L RNA usados}}$$

El RNA obtenido se cuantificó tomando 2 μ L del eluido y colocándolo en placa NanoDrop (Thermo Fisher ®). Mediante el equipo fotométrico MultiSkanGo®

(Thermo Fisher Scientific ®), se obtuvo la relación de absorbancias a 260 nm / 280 nm (pureza =1.8-2.1) y la concentración del RNA [ng/μL].

6.6 Electroforesis en gel de agarosa

La integridad del RNA se confirmó por una electroforesis en gel de agarosa, donde se evalúa por la aparición de 2 bandas bien definidas de rRNA (18S y 28S). Para ello se limpiaron acrílicos, vidrios y soportes con Etanol al 70% y se preparó el gel a concentración de 1% de agarosa (Bio-Rad®):

- Pesar 1 g de agarosa
- Agregar a 100 mL de agua bidestilada y libre de RNAsas
- Calentar hasta completa disolución
- Dejar enfriar sin que comience la polimerización (gelificado).

Esta mezcla se vertió en el soporte del gel y se dejó polimerizar; posteriormente, se colocó en la cámara de electroforesis (Bio-Rad®). Se agregó solución Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X hasta la marca señalada en la cámara de electroforesis. Se cargaron 5 μL de muestra con 5 μL de buffer de carga (azul de bromofenol) y 0.5 μL de SYBR® Gold (Thermo Fisher®). Se corrió a 80 mV, hasta la mitad del gel y se tomó la fotografía en la cámara UV.

6.7 Reacción de transcriptasa reversa (RT)

La RT es la reacción de transcripción reversa donde a partir del ácido ribonucleico mensajero (mRNA) se obtiene la copia del ácido desoxirribonucleico (cDNA). Para esta reacción, el kit de síntesis de cDNA utilizado fue el Script cDNA Syntesis Kit, Jena Bioscience®. Por reacción se requiere:

Tabla 2. Reactivos para la reacción de transcriptasa reversa (RT)

Reactivo	Volumen (μL)
Hexámeros	0.5
Script RT Buffer	4.0
Mezcla de dNTPs	1.0
Ditiotreitol (DTT)	1.0
Inhibidor de RNAsas	1.0
Script Transcriptasa Reversa	0.5
RNA 1000 ng	c.b.p
Agua libre de RNAsas	c.b.p. 20 μL

Posteriormente, se empleó el termociclador (Axigen Maxygene II, PCR punto final) con el siguiente programa:

Tabla 3. Condiciones para la reacción de transcriptasa reversa (RT)

Temperatura	Tiempo
42 °C	10 minutos
50 °C	60 minutos
70 °C	10 minutos
4 °C	indefinido

6.8 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o en tiempo real (qPCR) se emplea para cuantificar la expresión de un transcrito a partir de cDNA.

En la qPCR, los procesos de amplificación y detección, basados en técnicas de fluorescencia, se producen de manera simultánea. La medición de la cantidad de fluorescencia se realiza de forma continua, proporcionando información de la amplificación del cDNA en tiempo real, siendo una forma indirecta de cuantificar la expresión de los genes, mRNA.

Se emplearon sondas tipo TaqMan, las cuales se hibridan específicamente a la secuencia del gen a amplificar. Estas sondas son oligonucleótidos de cadena simple que llevan un fluoróforo informador en su extremo 3' (reportero) y un fluorocromo amortiguador en el extremo 5' ("quencher") que bloquea la emisión de fluorescencia. Cuando la Taq polimerasa se encuentra con la sonda, la hidroliza, gracias a su actividad exonucleasa 5'-3', causando la emisión de fluorescencia. De esta forma, la emisión de fluorescencia está relacionada con la cantidad de secuencias producidas (Lerma, Catasús, & Pons, 2013), *por ende*, de la cantidad del mRNA.

Para preparar la sonda a utilizar en la reacción, se hizo una dilución 1:5 del stock de 5 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$, obteniendo así una concentración de la sonda de 50 $\text{nmol}/\mu\text{L}$. Esta dilución es la que se ocupa en la reacción de qPCR. Para cada reacción (10 μL) se empleó lo siguiente:

Tabla 4. Reactivos para la reacción de qPCR

Reactivo	Concentración inicial	Volumen (μL)	Concentración final
qPCR ProbesMaster UNG (Jena Bioscience®)	-	5.0	-
Agua libre de RNAsas/DNAsas	-	3.5	-
Muestra cDNA (concentrado)	-	1.0	-
Sonda (Diluida 1:5)	5 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$	0.5	50 $\text{nmol}/\mu\text{L}$

Se colocaron por duplicado muestras de cada tratamiento en el termociclador (Aligent Stratagene MX30005P), bajo el perfil térmico consistente en:

Tabla 5. Perfil térmico de qPCR

Tiempo	Temperatura (°C)	Ciclos
1 minuto	50	1
2 minutos	95	1
15 segundos	95	40
1 minuto	60	40

Las sondas empleadas fueron *Kctd15* (Rn01458152_m1) y *Rpl32* (Rn00820748_g1) como control. Después, las reacciones fueron analizadas en el software Aligent AriaMx v.1.7, del cual se extrajeron los Ct.

Los Ct fueron tratados utilizando el método de delta delta Ct ($\Delta\Delta Ct$), el cual consiste en realizar la diferencia entre el promedio del gen de interés y el promedio del gen control. De esta forma, se obtiene la expresión relativa del gen *KCTD15* respecto al gen control *RPL32* (proteína ribosomal L32).

6.9 Secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS, por sus siglas en inglés)

El ensayo consiste en transfectar las células INS1 (832/13) con el siRNA contra *KCTD15* o control (*siK* o *siC*). Después de 72h de transfección, a las células se les retiró el medio y se les colocó 1 mL de la solución salina balanceada con HEPES (HBSS). Esta solución se dejó durante 2 horas, para que las células estén en ayuno y sin estímulo de glucosa, en su estado basal. Después, se cambió la solución por 1 mL de HBSS con diferentes concentraciones de D-glucosa (0, 3, 15 mM) por 1 h. Al término de este tiempo, se tomó una muestra de 500 μ L de sobrenadante y se congelaron a -20°C , para posteriormente medir la concentración de insulina secretada por medio de ELISA.

La solución HBSS consiste en 114 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.16 mM MgSO₄, 20 mM HEPES, 2.5 mM CaCl₂, 25.5 mM NaHCO₃, 0.2% albúmina de suero bovino, pH 7.2 (Hohmeier et al., 2000).

6.10 Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

El ensayo ELISA se emplea para la detección y cuantificación de antígenos, anticuerpos, hormonas y otras moléculas.

En un ELISA, un anticuerpo primario es inmovilizado por adsorción en un sustrato sólido. Después, se adiciona una solución de bloqueo para cubrir el sustrato sólido, seguido de una muestra de antígeno. Posteriormente, se adiciona un anticuerpo secundario que conduce a la subsecuente unión al antígeno ya unido al anticuerpo primario. Por último, se agrega una enzima que se une al anticuerpo secundario, seguido por un sustrato enzimático que conduce a la generación de color. La señal detectada es típicamente proporcional a la cantidad del antígeno.

Para este proyecto, se empleó el kit de ELISA para insulina de rata (ALPCO®). Se añadieron a la microplaca 10 µL de las muestras del sobrenadante de células estimuladas con 3 mM y 15 mM de D-glucosa diluidas en agua 1:3 y 1:5, respectivamente. Después se colocaron 75 µL del buffer con el anticuerpo conjugado. La microplaca se incubó a temperatura ambiente con agitación a 140 rpm por 2 h.

Al término de la primera incubación, se lavaron los pozos 6 veces con 300 µL de buffer de lavado. Se añadieron 100 µL de sustrato 3,3',5,5'-tetrametil-benzidina (TMB) y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente con agitación a 140 rpm. Se añadió 100 µL de solución de paro y se realizó lectura en equipo MultiSkan® Go (Thermo Fisher Scientific®) a 450 nm.

7. Resultados

7.1 Optimización de la extracción del RNA y su integridad

Uno de los propósitos de este trabajo es medir la expresión de *KCTD15*, para lo cual se extrajo RNA total de un cultivo de 600,000 células INS1 (832/13) incubadas por 72 h, con una confluencia del 70-80%.

Se realizó la extracción de RNA con el kit comercial de Jena Bioscience ®. Se tomaron un par de muestras y se corrieron en un gel de agarosa. Se observó que para ambas muestras se obtuvieron 2 bandas, correspondientes al rRNA 28S (superior) y 18S (inferior) (Figura 6).

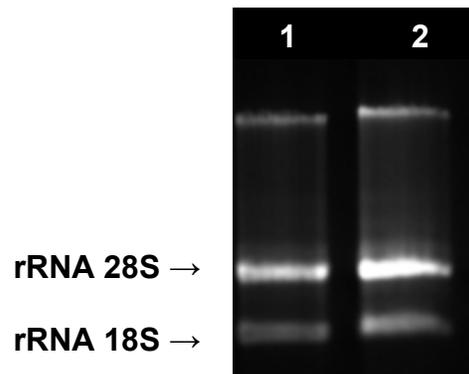


Figura 6. RNA extraído visualizado en un gel de agarosa.
(1,2) Dos muestras de prueba de RNA extraído de las células INS1(832/13).

7.2 Optimización de diferentes concentraciones de la sonda y cDNA para amplificar el transcrito de *KCTD15* en las células INS1 (832/13)

Anteriormente, se había reportado que el gen *KCTD15* se expresa en el páncreas humano (Willer et al., 2009). Sin embargo, se desconocía si este gen se expresa en el páncreas de rata y en nuestro modelo de estudio, en las células derivadas de páncreas de rata, INS1 (832/13). Para responder esto, lo primero fue optimizar la cantidad de sonda de *KCTD15* y la concentración del cDNA, para la reacción de qPCR. Se probaron diferentes condiciones, las cuales fueron: a) la concentración de sonda de *KCTD15*, ya sea 250 nmol/ μ L o 50 nmol/ μ L (dilución 1:5

del concentrado), empleando 0.5 μL de la sonda; b) diferentes volúmenes de cDNA, utilizando 2 μL , 1 μL o 1 μL de cDNA diluido 1:5 (Figura 7).

Al emplear 250 nmol/ μL de sonda (A, B, C, D), las curvas muestran una mayor fluorescencia comparadas con las curvas donde se utilizó 50 nmol/ μL de sonda (E, F, G, H). A pesar de ello, se obtiene una considerable intensidad de la señal de fluorescencia al usar 50 nmol/ μL de sonda. Los valores obtenidos de los Ct se muestran en la Tabla 6.

Respecto a la optimización de la concentración y volumen de cDNA, se observó que al utilizar 250 nmol/ μL de sonda y 2 μL , 1 μL o 1 μL de cDNA diluido 1:5, se obtuvieron los Ct de 24.71, 26.72 y 29.93, respectivamente. Por otra parte, al usar 50 nmol/ μL de sonda y 2 μL , 1 μL o 1 μL de cDNA diluido 1:5, se obtuvieron los Ct de 27.58, 29.37 y 31.56, respectivamente.

Al comparar las curvas de la sonda a la concentración de 250 nmol/ μL con la sonda a la concentración de 50 nmol/ μL , se observa que los Ct son mayores con la sonda a 50 nmol/ μL , pero se conserva la tendencia en cada tratamiento. La intensidad de la señal de fluorescencia disminuyó al utilizar la sonda diluida, no obstante, es posible emplearla al diluirla. De esta forma, se podrá obtener el mismo resultado, pero ahorrando reactivo.

Tabla 6. Valores Ct de optimización de sonda y cDNA para ensayos de qPCR

Símbolo	250 nmol/μL de sonda (concentrada)	Ct (ΔR)
A	1 μL dilución 1:5 de cDNA	29.93
B	1 μL de cDNA	26.72
C	2 μL de cDNA	24.71
D	Control negativo, agua	No Cq
Símbolo	50 nmol/μL de sonda (diluida 1:5)	Ct (ΔR)
E	1 μL dilución 1:5 de cDNA	31.56
F	1 μL de cDNA	29.37
G	2 μL de cDNA	27.58
H	Control negativo, agua	No Cq

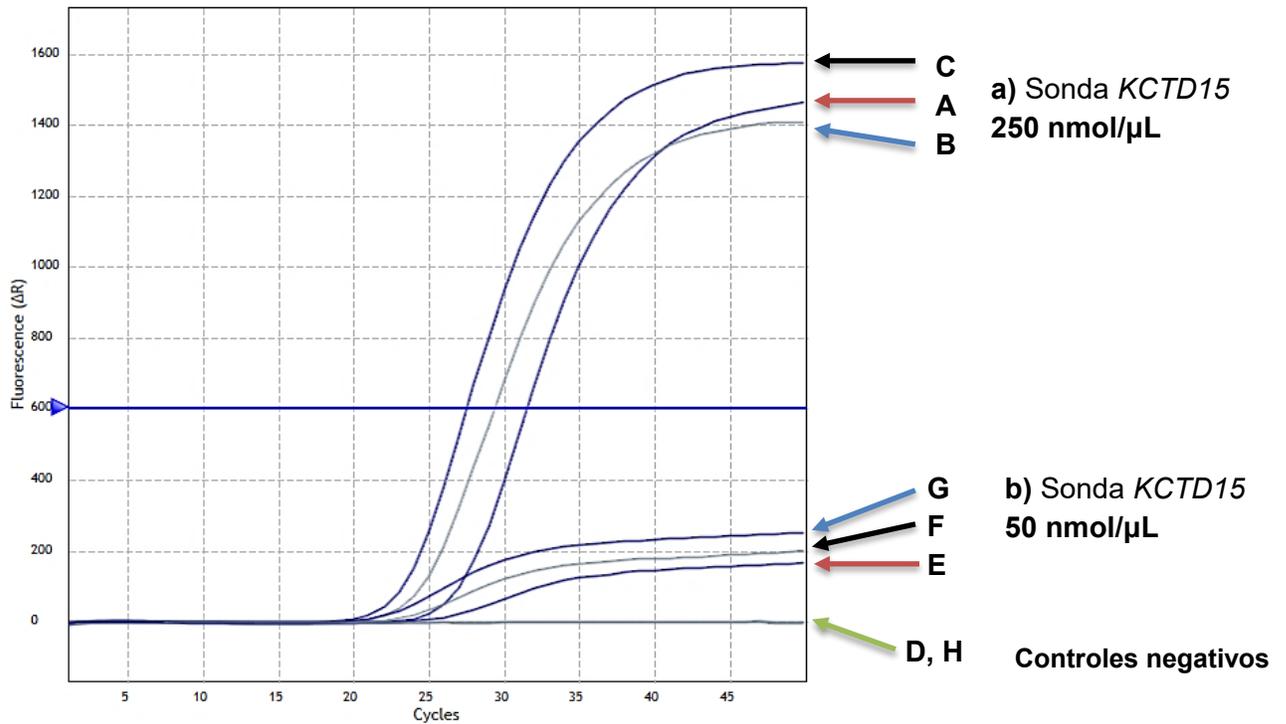


Figura 7. Gráfica de amplificación del gen *KCTD15* en células INS1 (832/13). A) 250 nmol/μL de sonda con 1 μL dilución 1:5 de cDNA, **B)** 250 nmol/μL de sonda con 1 μL de cDNA, **C)** 250 nmol/μL de sonda con 2 μL de cDNA, **D)** Control negativo con agua libre de RNAsas, **E)** 50 nmol/μL de sonda con 1 μL dilución 1:5 de cDNA, **F)** 50 nmol/μL de sonda con 1 μL de cDNA, **G)** 50 nmol/μL de sonda con 2 μL de cDNA, **H)** Control negativo con agua libre de RNAsas.

Estos experimentos permitieron determinar las condiciones óptimas para los ensayos posteriores, las cuales fueron: 50 nmol/μL de sonda (sonda diluida 1:5, 1 μL) y 1 μL cDNA concentrado.

7.3 Optimización de la concentración de siRNAs y del tiempo de transfección para el silenciamiento parcial de *KCTD15*

Tras confirmarse la expresión del gen *KCTD15* en las células INS1 (832/13), se optimizaron las condiciones para el silenciamiento parcial del gen, empleando

diferentes cantidades del agente de transfección y variando la concentración de siRNA contra *KCTD15* o control.

Las condiciones probadas fueron 1 μ L de agente de transfección con (a) 10 nM de siRNA *KCTD15* (*siK*), (b) 20 nM de *siK*, (c) 40 nM de *siK*. (d) 2 μ L de agente de transfección con 10 nM de *siK*. (e) 1 μ L de agente de transfección con 20 nM de siRNA Control (*siC*). (f) Control del cultivo celular sin transfección. La transfección se llevó a cabo por 72 horas.

Se observó que en ninguna de las diferentes condiciones de transfección se modificó el fenotipo o morfología de las células (Figura 8). Por otra parte, se empleó como control de células sin transfección, para visualizar los cambios en el fenotipo y confluencia por el efecto de la transfección. No se encontraron cambios ni en el fenotipo ni en la morfología de las células a diferentes concentraciones del *siK* (Figura 8).

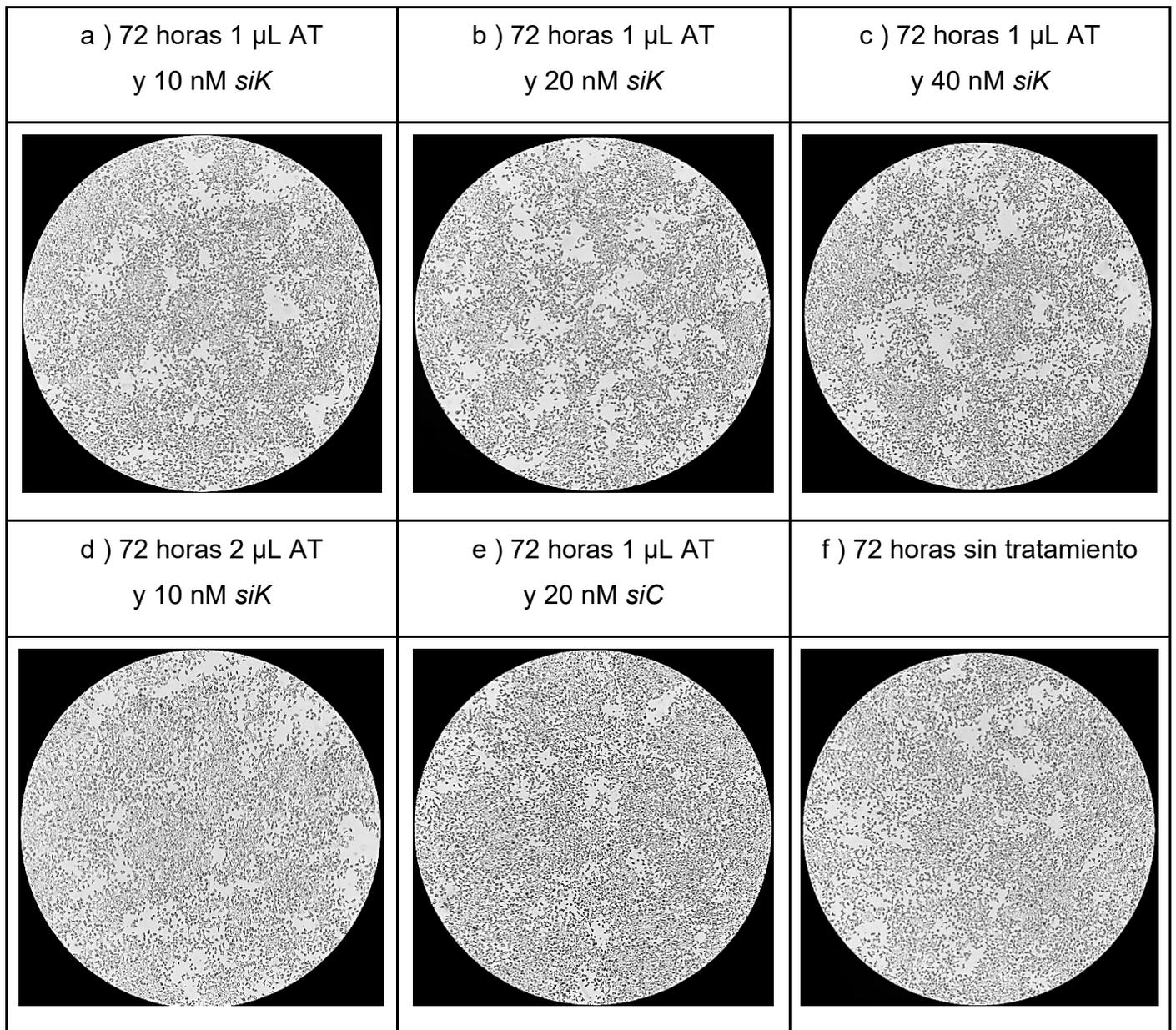


Figura 8. Fenotipo y morfología de las células INS1 (832/13) después del silenciamiento parcial de *KCTD15*, con diferentes concentraciones de *siK*, a las 72 h post-transfección. Diferentes condiciones de concentración de *siK* (a-c) utilizando 1 μ L de agente de transfección. a) 10 nM de *siK*. b) 20 nM de *siK*. c) 40 nM de *siK*. d) 2 μ L de agente de transfección y 10 nM de *siK*. e) 1 μ L de agente de transfección y 20 nM de *siC*. f) Control del cultivo celular sin transfección.

Se analizaron los niveles del transcrito de *KCTD15* en las diferentes condiciones de la optimización de la concentración del siRNA para evaluar el grado de silenciamiento (Figura 9). Se observó que al utilizar 1 μ L del agente de transfección y a las concentraciones de 10 y 20 nM del *siK*, el gen *KCTD15* se silenció en un 50%. Para la concentración de 40 nM del *siK*, la expresión del gen se suprimió en un 70%. Además, con 2 μ L del agente de transfección y con 20 nM del siRNA, no se observó silenciamiento; al contrario, aumentó la expresión del gen (Figura 9). Por lo tanto, la condición con que se logró suprimir el gen en mayor medida fue 1 μ L de agente de transfección y 40 nM de *siK* a las 72 horas post-transfección.

En el experimento anterior, la transfección duró 72 horas, basados en experimentos realizados en el laboratorio para otros genes. Sin embargo, era necesario encontrar el tiempo óptimo post-transfección para poder suprimir al gen *KCTD15*. Por lo que se realizaron transfecciones por 24, 48 y 72 horas.

En la Figura 10, se muestra la expresión relativa de *KCTD15* comparado contra el *siC*; donde a las 24 horas post-transfección, el transcrito se redujo en un 13%, a las 48 horas un 69% y a las 72 horas se redujo en un 87%. Por lo tanto, el tiempo óptimo de transfección para lograr un mayor silenciamiento parcial del gen *KCTD15* fue de 72 horas.

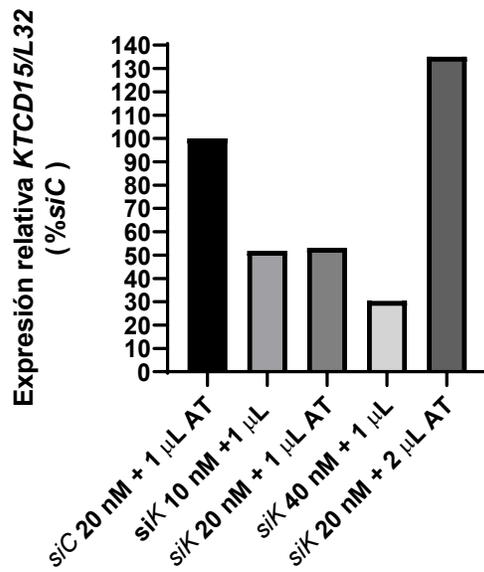


Figura 9. Porcentaje del silenciamiento parcial de *KCTD15* al optimizar diferentes concentraciones del siRNA a las 72 horas post-transfección de células INS1 (832/13). Diferentes concentraciones de *siK* empleando 1 µL de agente de transfección (a-c) y 2 µL de agente de transfección (d). a) 10 nM *siK*. b) 20 nM *siK*. c) 40 nM *siK*. d) 20 nM *siK*. *siC* 20 nM y 1 µL de agente de transfección. El tratamiento con *siC* se consideró como 100% de transfección temporal por 72 horas.

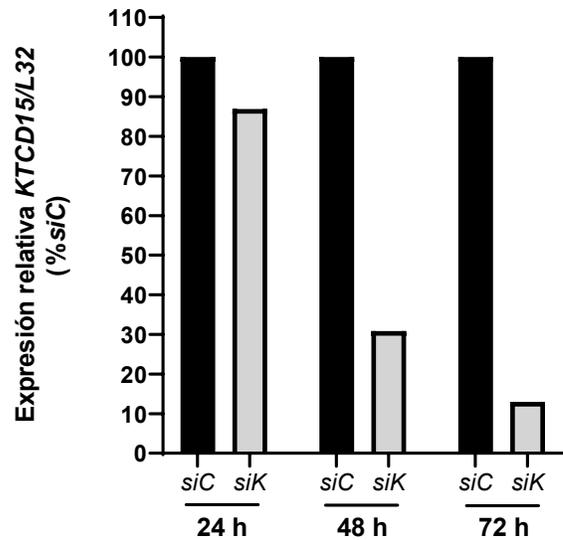


Figura 10. Porcentaje del silenciamiento parcial de *KCTD15* a las 24, 48 y 72 horas post-transfección. Diferentes tiempos de post-transfección empleando 40 nM de *siK* o *siC* y 1 µL de agente de transfección. La expresión relativa se midió a 24, 48 y 72 horas post-transfección. El tratamiento 40 nM de *siC* y 1 µL de agente de transfección se consideró el 100 % de expresión.

AT, Agente de Transfección; *siC*, siRNA Control; *siK*, siRNA *KCTD15*.

Por lo tanto, en todos los experimentos que se describirán a continuación, se utilizaron las condiciones óptimas de transfección: 1 μ L de agente de transfección y 40 nM de *siK* o *siC*, durante 72 horas. Para la cuantificación del transcrito por medio de qPCR, las condiciones óptimas son: 50 nmol/ μ L de sonda y 5 ng/ μ L de cDNA.

Una vez optimizadas las condiciones, las células fueron transfectadas con *siC* o *siK* y después de 72 horas se verificó el silenciamiento parcial de *KCTD15*. La Figura 11 muestra que se logró un silenciamiento parcial de *KCTD15* del 60% con respecto a las células control (*siC*).

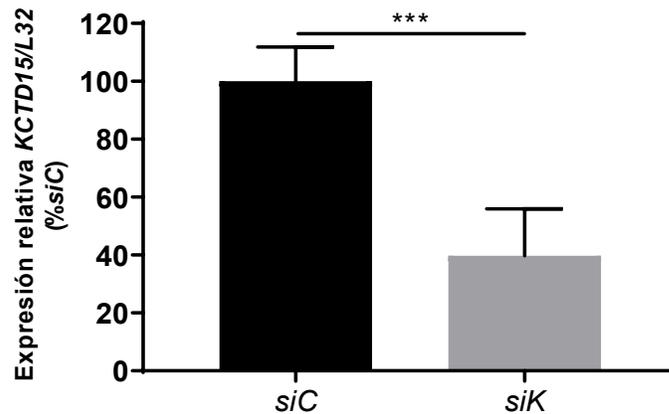


Figura 11. Porcentaje de expresión relativa de *KCTD15* a las 72 horas post-transfección. Expresión relativa de *KCTD15* en células transfectadas con *siC* o con *siK*. La expresión de *KCTD15* se redujo en un 60% con respecto al control. T de Student a dos colas, *** $p = 0.0005$, $n = 3$.

Para asegurarse de que el silenciamiento parcial de *KCTD15* no influyera en la proliferación celular, se hizo el conteo del número de células. Se demostró que no existía diferencia significativa en el número de células entre las células control y las células silenciadas de *KCTD15* (Figura 12).

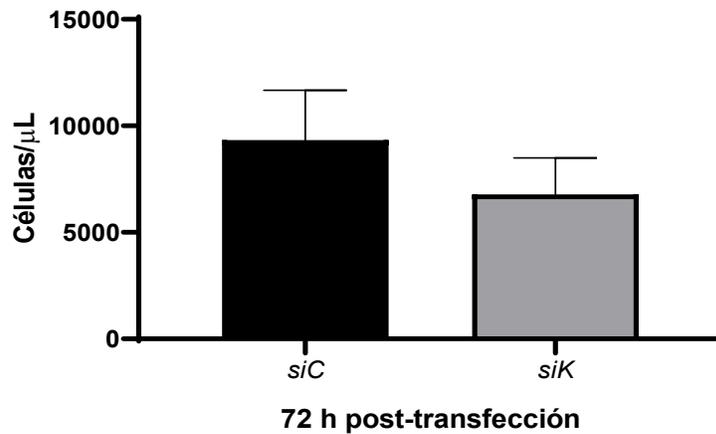


Figura 12. Efecto del silenciamiento parcial de *KCTD15* en el número de células INS1 (832/13). Conteo celular expresado en células por microlitro de células a las 72 horas de transfección con 1 μ L de AT y 40 mM *siC* o *siK*. No se encontró diferencia en el número de células entre los dos tratamientos. T de Student a dos colas, $p = 0.2008$, $n = 3$.

7.4 Expresión de *KCTD15* en condiciones de baja y alta concentración de glucosa

Debido a que anteriormente se había reportado que *KCTD15* respondía a dieta alta en grasas y a condiciones de ayuno, se estudió si este gen pudiera ser regulado también por glucosa. Para ello, se estimularon las células con 3 diferentes concentraciones de glucosa: 0, 3 y 15 mM de D-glucosa.

En las células control se observó que la expresión de *KCTD15* aumentó conforme se incrementó la concentración de glucosa, siendo de 100%, 222.2% y 260.5% la expresión, bajo los diferentes estímulos con D-glucosa (0, 3 y 15 mM). Para las células silenciadas parcialmente de *KCTD15*, la estimulación de glucosa no generó ningún cambio significativo en la expresión de este gen, siendo de 61%, 53% y 46% tras estimular con D-glucosa (0, 3 y 15 mM) (Figura 13).

Por lo tanto, el gen *KCTD15* se expresa en las células INS1 (832/13) y esta expresión se modifica al estimular las células con diferentes concentraciones de D-glucosa por 1 hora. Además, se pudo silenciar parcialmente a las 72 horas post-transfección parcial.

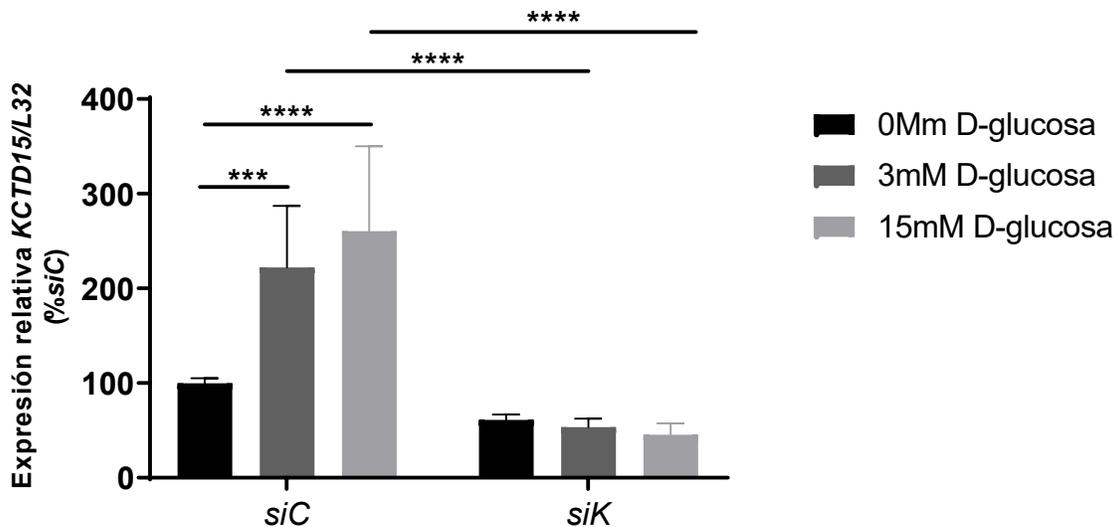


Figura 13. Porcentaje de expresión relativa de *KCTD15* en presencia de estímulos de D-glucosa. Células transfectadas con *siC* o *siK* y estimuladas por una hora con diferentes concentraciones de D-glucosa (0, 3 y 15 mM). Prueba de ANOVA de dos vías, 95% CI Bonferroni, *** p : 0.0002, **** p < 0.0001, n = 3.

7.5 Efecto del silenciamiento parcial de *KCTD15* sobre la secreción de insulina en células INS1 (832/13)

Como se mencionó anteriormente, la función de *KCTD15* es aún desconocida. Se ha propuesto que *KCTD15* pudiera ser un canal de potasio o bien un factor transcripcional. Como canal de potasio, *KCTD15* podría influir en la despolarización de membrana y, *por ende*, en la secreción de insulina; o bien, como un factor transcripcional que module la expresión de genes involucrados en la secreción de insulina. Nosotros estamos interesados en ver si *KCTD15* está involucrado en la secreción de insulina y de ser así, investigar en un futuro, si participa mediante alguna de estas dos funciones.

Al observar que la estimulación con diferentes concentraciones de glucosa provoca cambios en la expresión de *KCTD15* y que, al silenciarlo parcialmente, no se modificó en gran medida su expresión, se quiso estudiar si estos cambios de expresión se reflejaban en la secreción de insulina.

Se midió la concentración de insulina en 3 experimentos con células transfectadas con *siC* o *siK* a las 72 horas post-transfección y estimuladas durante 1 hora con dos concentraciones (3 y 15 mM) de D-glucosa.

En las células control se obtuvo una concentración de insulina secretada de 2.57 y 7.43 pM, tras estimular con 3 y 15 mM de D-glucosa, respectivamente. Esto representa un aumento 2.9 veces en la secreción de insulina entre las dos diferentes concentraciones, tal como se esperaba (Figura 14). Mientras que en las células silenciadas parcialmente de *KCTD15* se obtuvo 2.23 y 5.99 pM de insulina secretada bajo estimulación con D-glucosa a 3 y 15 mM, respectivamente (Figura 14). En las células control, se observó una diferencia significativa entre 3 y 15 mM de glucosa. En las células parcialmente silenciadas de *KCTD15*, se observó la misma tendencia que las células control, sin alcanzar la significancia. Sin embargo, no se observó una diferencia significativa de la secreción de la insulina entre las células controles y las parcialmente silenciadas de *KCTD15* en las dos concentraciones de glucosa.

Por lo tanto, esto apoya que *KCTD15* no está implicado en la secreción de insulina.

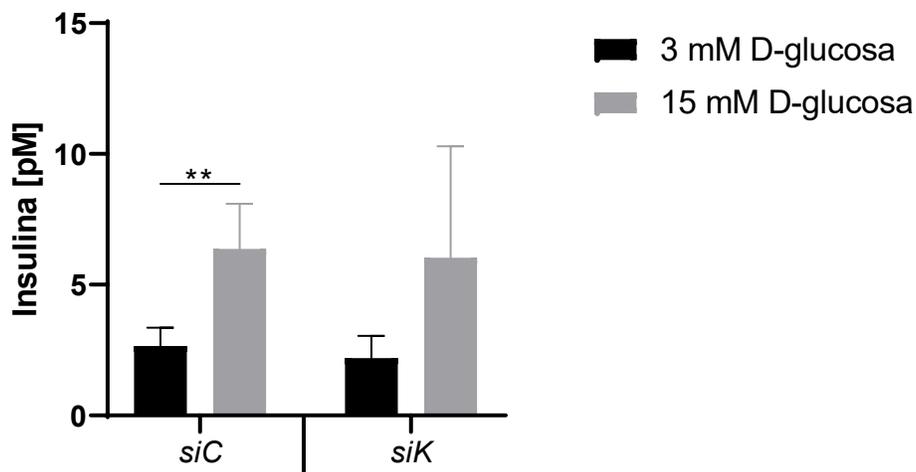


Figura 14. Efecto del silenciamiento parcial de *KCTD15* en la secreción de insulina en las células INS1 (832/13). Células transfectadas con *siC* o *siK* y estimuladas por una hora con diferentes concentraciones de D-glucosa (3 y 15 mM). Concentración de insulina, expresada en picomol (pM), empleando *siC* o *siK*. T de Student a dos colas, ** $p < 0.0100$, $n = 3$.

8. Discusión

Un reto importante acerca del gen *KCTD15* es que aún se desconoce su función (Teng et al., 2019) y su implicación en la asociación con la obesidad. Por ello, se buscó el gen *KCTD15* en células derivadas de un órgano relacionado con la regulación energética, como lo es el páncreas y su relación con la secreción de insulina (Han et al., 2018).

Anteriormente, no se había reportado su expresión en páncreas, por lo que nuestro primer objetivo era ver si *KCTD15* se expresaba en las células derivadas de páncreas de rata INS1 (832/13). Se observó que el transcrito de *KCTD15* se encuentra presente en las células INS1 (832/13). Esto sugiere que el gen *KCTD15* se expresa en el páncreas de rata. Además, en humanos se había visto que *KCTD15* se expresaba en varios órganos relacionados con la homeostasis energética y de la glucosa (Willer et al., 2009), como lo es el páncreas.

Posteriormente, se optimizaron los ensayos de transfección, los cuales son una herramienta molecular que nos ayuda a silenciar el gen, para poder conocer así su función, comparándolo contra las células control. El gen *KCTD15* se logró silenciar parcialmente, resultando en una expresión restante del 39.74% (Figura 11). Esto no tuvo repercusión en el número de células (Figura 11), por lo que podemos suponer que no afecta la proliferación celular. Anteriormente en nuestro laboratorio, se había observado que empleando el mismo modelo celular y silenciando al gen *ETV5*, disminuye el número de células, debido a una menor proliferación (Díaz-López, 2019). Sin embargo, *KCTD15* no afectó el número de células.

Sabiendo que *KCTD15* se expresa en las células INS1 (832/13) (Figura 7) y que es posible silenciarlo (Figura 11), la siguiente pregunta fue si este gen era regulado por glucosa. Resulta de especial interés que la expresión relativa de *KCTD15* aumenta cuando se estimula con D-glucosa (Figura 13). Este comportamiento se asemeja al observado anteriormente en el hipotálamo de rata, donde en un estado postprandial, el transcrito de *KCTD15* es mayor comparado con un estado de ayuno (Figura 4b) (Gutierrez-Aguilar et al., 2012). Por lo tanto,

KCTD15 podría tener una implicación con el balance energético, tanto en hipotálamo como en páncreas.

En un estado de ayuno, la expresión de *KCTD15* se ve disminuida (Figura 4b), al igual que el transcrito de *POMC*, en el hipotálamo de ratas que se encontraban en ayuno (Gutierrez-Aguilar et al., 2012). Las neuronas POMC se han relacionado con la supresión del apetito e incremento del gasto energético, y su transcrito sufre cambios dependiendo del estado energético (Dodd et al., 2018; Parton et al., 2007; Varela & Horvath, 2012).

POMC es considerado un gen que provoca obesidad monogénica, debido a su importante función anorexigénica (O’Rahilly, Farooqi, Yeo, & Challis, 2003). Por lo tanto, esto hace pensar que *KCTD15* pudiera tener un efecto en la regulación de la balanza energética. Además, se ha reportado que el gen homólogo de *KCTD15* en *Drosophila* y ratón regulan la ingesta de alimento (Williams et al., 2014).

Asimismo, se ha planteado que las neuronas POMC juegan un papel de regulación en el páncreas. Estas neuronas están involucradas en respuestas de activación, que derivan en la percepción de glucosa y la adaptación fisiológica a la secreción de insulina en páncreas (Ramírez et al., 2017). Esto quiere decir que, si la actividad de las neuronas POMC se ve afectada, la secreción de insulina se ve alterada en las células beta pancreáticas. Por lo cual, *KCTD15* también podría verse involucrado con la secreción de insulina.

Además, se ha reportado que *KCTD15* disminuye significativamente su expresión en una dieta alta en grasas en hígado, tejido adiposo, cerebro e hipotálamo (Yoganathan et al., 2012), y se ha atribuido que una alta ingesta en grasas ocasiona perturbaciones en la regulación del balance de energía (Pagliassotti, Gayles, & Hill, 1997).

Debido a los cambios de expresión en diversos tejidos, es imperante la necesidad de conocer el papel fisiológico de *KCTD15* en cada uno de ellos para determinar de manera clara la participación de este gen en la homeostasis energética y de la glucosa. Previamente, se ha reportado una asociación entre *KCTD15* y la resistencia a la insulina en población europea (Robiou-du-Pont et al.,

2013), así como su asociación a un riesgo de resistencia a insulina en niños chinos (Xi et al., 2014), por lo que quisimos ver si este gen podría modificar la secreción de insulina como un mecanismo compensatorio.

Se ha propuesto que *KCTD15* puede ser un canal de potasio que estuviera involucrado en la secreción de insulina. Anteriormente se había reportado que al silenciar al gen del canal de potasio dependiente de voltaje, *Kv2.1*, en islotes de rata, la secreción de insulina se ve disminuida (Greitzer-Antes et al., 2018). Otro estudio reportó que en ratones transgénicos, al mutar la subunidad de Kir6.2 de los canales K_{ATP} , la insulina sérica fue menor respecto a la insulina sérica en ratones no mutados (Koster, Permutt, & Nichols, 2005), lo cual implica una disminución en la secreción pancreática de insulina.

Nuestros resultados muestran que *KCTD15* parcialmente silenciado, no está implicado en la secreción de insulina (Figura 14), ya que la insulina secretada a 3 y 15 mM de glucosa fue similar en presencia o ausencia de *KCTD15*. Por lo tanto, lo anterior sugiere que *KCTD15* no es un canal de potasio. Esto se debe a que los canales de potasio conocidos e involucrados en la secreción de insulina, disminuyen la secreción de insulina al estar ausentes.

En este proyecto se estudió la implicación de *KCTD15* en la secreción de la insulina y no su actividad como canal de potasio. Sin embargo, para determinar si *KCTD15* tiene función como canal de potasio, es necesario llevar a cabo ensayos de electrofisiología para comprobar dicha función. Por otra parte, los análisis estructurales de la proteína sugieren que pudiera ser regulador de un canal de potasio como *Kv1.2*, lo cual se deberá comprobar en un futuro.

Por otro lado, existe evidencia de que *KCTD15* pueda ser un factor transcripcional. La proteína *KCTD15* es secuencialmente muy parecida a la proteína *KCTD1*, en un 79% (Pirone et al., 2019). Se ha reportado que *KCTD1* es un factor transcripcional, el cual promueve la adipogénesis mediante la remoción de AP-2 α del núcleo de preadipocitos (Pirone et al., 2019). Además, se sabe que *KCTD15* reprime a la proteína del gen *TFAP2A* (Chambers, Clark, Gatz, & Wingert, 2020), y que muestra inhibición de proteínas dentro de la vía AP-2 α (Zarelli & Dawid, 2013),

por lo que se requieren más estudios para determinar el mecanismo de KCTD15 como factor transcripcional.

Se ha reportado que *KCTD1* tiene expresión en algunos tejidos humanos donde también se expresa *KCTD15*, tales como el cerebro, adipocitos y páncreas, aunque el nivel de expresión de ambos genes en los tejidos es distinto (Base de datos BioProject NCBI, BioSample). Además, ambas proteínas interactúan con AP-2 α , molécula involucrada en procesos del desarrollo embrionario en mamíferos y diferenciación celular.

Sin embargo, *KCTD1* no ha sido asociado a la obesidad, pese a la similitud entre las secuencias de su proteína con la proteína del gen *KCTD15*. Hasta el momento no se sabe si ambas proteínas intervienen en los mismos procesos moleculares, ni tampoco si la ausencia de KCTD15 pueda ser compensada por KCTD1. Por lo que esto abre varias posibilidades de investigación.

En este proyecto, se buscaba ver si KCTD15 podía regular la secreción de insulina, para posteriormente investigar si lo hacía por su función como canal de potasio o factor transcripcional. Sin embargo, al no modificar la secreción de insulina, no se continuó con el estudio de su función en las células INS1 (832/13).

Finalmente, la expresión de *KCTD15* aumenta por la presencia de glucosa en las células INS1 (832/13) y disminuye en una dieta alta en grasas en el hipotálamo de las ratas (Gutierrez-Aguilar et al., 2012). Esto confirma que este gen está implicado en la homeostasis energética. Sin embargo, pudimos comprobar que no regula la secreción de insulina.

9. Conclusión

KCTD15 responde a estímulos de glucosa, pero no está implicado en la secreción de insulina estimulada por glucosa en las células INS1 (832/13).

10. Perspectivas

Estudiar si *KCTD15* responde a la glucosa en cultivo celular hipotalámico (IVB), tal como se ha visto en cultivo celular pancreático.

Para conocer si *KCTD15* pudiera actuar como canal de potasio, es necesario realizar pruebas de electrofisiología tanto en el cultivo celular pancreático (INS1 832/13) y en cultivo celular hipotalámico (IVB).

Se requiere investigación sobre el papel de *KCTD15* en hipotálamo y tejido adiposo, para establecer una relación entre el balance energético y la obesidad.

11. Referencias

- Afshin, A., Forouzanfar, M. H., Reitsma, M. B., Sur, P., Estep, K., Lee, A., ... Murray, C. J. L. (2017). Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. *New England Journal of Medicine*, 377(1), 13–27. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1614362>
- Andolfi, C., & Fisichella, P. M. (2018). Epidemiology of Obesity and Associated Comorbidities. *Journal of Laparoendoscopic & Advanced Surgical Techniques*, 28(8), 919–924. <https://doi.org/10.1089/lap.2018.0380>
- Aponte, Y., Atasoy, D., & Sternson, S. M. (2011). AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nature Neuroscience*, 14(3), 351–355. <https://doi.org/10.1038/nn.2739>
- Bixby, K. A., Nanao, M. H., Shen, N. V., Kreusch, A., Bellamy, H., Pfaffinger, P. J., & Choe, S. (1999). Zn²⁺-binding and molecular determinants of tetramerization in voltage-gated K⁺ channels. *Nature Structural Biology*, 6(1), 38–43. <https://doi.org/10.1038/4911>
- Boticario, C., & Calvo, S. (2013). *Nutrición y Dietética II: aspectos clínicos* (1a ed.). Barcelona: UNED.
- Bray, G. A. (1999). Etiology and pathogenesis of obesity. *Clinical Cornerstone*, 2(3), 1–15. [https://doi.org/10.1016/S1098-3597\(99\)90001-7](https://doi.org/10.1016/S1098-3597(99)90001-7)
- Brunzell, J. D., Robertson, R. P., Lerner, R. L., Hazzard, W. R., Ensink, J. W., Bierman, E. L., & Porte, D. (1976). Relationships Between Fasting Plasma Glucose Levels and Insulin Secretion During Intravenous Glucose Tolerance Tests. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 42(2), 222–229. <https://doi.org/10.1210/jcem-42-2-222>
- Castle, N. A. (2010). Pharmacological modulation of voltage-gated potassium channels as a therapeutic strategy. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 20(11), 1471–1503. <https://doi.org/10.1517/13543776.2010.513384>
- Chambers, B., Clark, E., Gatz, A., & Wingert, R. (2020). Kctd15 Regulates Nephron Segment Differentiation by Repressing Tfp2a Activity. *The FASEB Journal*, 34(S1), 1–1. <https://doi.org/10.1096/fasebj.2020.34.s1.05325>
- Clevers, H., & Nusse, R. (2012). Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell*.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.012>

Curry, D. L., Bennet, L. L., & Grodsky, G. M. (1968). Dynamics of Insulin Secretion by the Perfused Rat Pancreas. *Endocrinology*, 83(3), 572–584. <https://doi.org/10.1210/endo-83-3-572>

Díaz-López, Y. E. (2019). *Implicación de ETV5 en la regulación de la proliferación celular de las células INS-1 (832/13) y sus genes blanco* (Universidad Nacional Autónoma de México). Recuperado de <http://132.248.9.195/ptd2019/diciembre/0798907/Index.html>

Ding, X., Luo, C., Ren, K., Zhang, J., Zhou, J., Hu, X., ... Zhang, J. (2008). Characterization and expression of a human KCTD1 gene containing the BTB domain, which mediates transcriptional repression and homomeric interactions. *DNA Cell Biol.*, 27(5), 257–265. <https://doi.org/doi:10.1089/dna.2007.0662>

Ding, X., Luo, C., Zhou, J., Zhong, Y., Hu, X., Zhou, F., ... Zhang, J. (2009). The interaction of KCTD1 with transcription factor AP-2 α inhibits its transactivation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 106(2), 285–295. <https://doi.org/10.1002/jcb.22002>

Dodd, G. T., Michael, N. J., Lee-Young, R. S., Mangiafico, S. P., Pryor, J. T., Munder, A. C., ... Tiganis, T. (2018). Insulin regulates POMC neuronal plasticity to control glucose metabolism. *eLife*, 7, 1–30. <https://doi.org/10.7554/eLife.38704>

Eckert, D., Buhl, S., Weber, S., Jäger, R., & Schorle, H. (2005). The AP-2 family of transcription factors. *Genome Biology*, 6(13). <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-13-246>

EMBL-EBI. (2020). Expression Atlas EMBL-EBI. Recuperado el 10 de septiembre de 2020, de <https://bit.ly/3bVuhL2>

ENSANUT. (2018). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018. *Ensanut 2018*, 1–42. Recuperado de <https://www.inegi.org.mx/programas/ensanut/2018/default.html#Documentacion>

Ford, E. S., Williamson, D. F., & Liu, S. (1997). Weight Change and Diabetes Incidence: Findings from a National Cohort of US Adults. *American Journal of Epidemiology*, 146(3), 214–222. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a009256>

- Fu, J., Dai, X., Plummer, G., Suzuki, K., Bautista, A., Githaka, J. M., ... MacDonald, P. E. (2017). Kv2.1 clustering contributes to insulin exocytosis and rescues human β -cell dysfunction. *Diabetes*, 66(7), 1890–1900. <https://doi.org/10.2337/db16-1170>
- Gaisano, H. Y. (2014). Here come the newcomer granules, better late than never. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 25(8), 381–388. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2014.03.005>
- Gharbi, N., Zhao, X.-F., Ellingsen, S., & Fjose, A. (2012). Zebrafish enhancer trap line showing maternal and neural expression of kctd15a. *Development, Growth & Differentiation*, 54(2), 241–252. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2011.01326.x>
- Greitzer-Antes, D., Xie, L., Qin, T., Xie, H., Zhu, D., Dolai, S., ... Gaisano, H. Y. (2018). Kv2.1 clusters on β -cell plasma membrane act as reservoirs that replenish pools of newcomer insulin granule through their interaction with syntaxin-3. *Journal of Biological Chemistry*, 293(18), 6893–6904. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002703>
- Gutierrez-Aguilar, R., Kim, D.-H., Woods, S. C., & Seeley, R. J. (2012). Expression of New Loci Associated With Obesity in Diet-Induced Obese Rats: From Genetics to Physiology. *Obesity*, 20(2), 306–312. <https://doi.org/10.1038/oby.2011.236>
- Han, Y. E., Chun, J. N., Kwon, M. J., Ji, Y. S., Jeong, M. H., Kim, H. H., ... Ho, W. K. (2018). Endocytosis of KATP Channels Drives Glucose-Stimulated Excitation of Pancreatic β Cells. *Cell Reports*, 22(2), 471–481. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.049>
- Herrera, B. M., & Lindgren, C. M. (2010). The genetics of obesity. *Current Diabetes Reports*, 10(6), 498–505. <https://doi.org/10.1007/s11892-010-0153-z>
- Hohmeier, H. E., Mulder, H., Chen, G., Henkel-Rieger, R., Prentki, M., & Newgard, C. B. (2000). Isolation of INS-1-derived cell lines with robust ATP-sensitive K⁺ channel-dependent and -independent glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes*, 49(3), 424–430. <https://doi.org/10.2337/diabetes.49.3.424>
- Houten, M. Van, Posner, B. I., Kopriwa, B. M., & Brawer, J. R. (1979). Insulin-binding sites in the rat brain: In vivo localization to the circumventricular organs by

- quantitative radioautography. *Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/endo-105-3-666>
- IMSS. (2009). Diagnóstico, tratamiento y prevención de sobrepeso y obesidad en el adulto. *Guía de Referencia Rápida*.
- Ivanov, D. V., Tyazhelova, T. V., Lemonnier, L., Kononenko, N., Pestova, A. A., Nikitin, E. A., ... Baranova, A. V. (2003). A new human gene KCNKG encoding potassium channel regulating protein is a cancer suppressor gene candidate located in 13q14.3. *FEBS Letters*, 539(1–3), 156–160. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00211-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00211-4)
- Jensen, M. V., Haldeman, J. M., Zhang, H., Lu, D., Huising, M. O., Vale, W. W., ... Newgard, C. B. (2013). Control of Voltage-gated Potassium Channel Kv2.2 Expression by Pyruvate-Isocitrate Cycling Regulates Glucose-stimulated Insulin Secretion. *Journal of Biological Chemistry*, 288(32), 23128–23140. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.491654>
- Jiang, M.-S., Tang, Q.-Q., McLenithan, J., Geiman, D., Shillinglaw, W., Henzel, W. J., & Lane, M. D. (1998). Derepression of the C/EBP gene during adipogenesis: Identification of AP-2 as a repressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(7), 3467–3471. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.7.3467>
- Kelly, K. F., & Daniel, J. M. (2006). POZ for effect – POZ-ZF transcription factors in cancer and development. *Trends in Cell Biology*, 16(11), 578–587. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2006.09.003>
- Koster, J. C., Permutt, M. A., & Nichols, C. G. (2005). Diabetes and insulin secretion: The ATP-sensitive K⁺ channel (KATP) connection. *Diabetes*, 54(11), 3065–3072. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.11.3065>
- Lang, J. (1999). Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion. *European Journal of Biochemistry*, 259(1–2), 3–17. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00043.x>
- Leland J. Cseke, Ara Kirakosyan, Peter B. Kaufman, M. V. W. (2011). *Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine* (3rd Editio). USA: CRC Press.
- Lerma, E., Catasús, L., & Pons, C. (2013). *Aplicación de Nuevas Técnicas en el Diagnóstico Citológico: Cuadernos de Citopatología N°10*. España: Diaz de

Santos.

- Liang, S. S., Ouyang, H. J., Liu, J., Chen, B., Nie, Q. H., & Zhang, X. Q. (2015). Expression of variant transcripts of the potassium channel tetramerization domain-containing 15 (KCTD15) gene and their association with fatness traits in chickens. *Domestic Animal Endocrinology*, *50*, 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2014.09.006>
- MacDonald, B. T., Tamai, K., & He, X. (2009). Wnt/ β -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. *Developmental Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.016>
- Meyre, D., Delplanque, J., Chèvre, J. C., Lecoœur, C., Lobbens, S., Gallina, S., ... Froguel, P. (2009). Genome-wide association study for early-onset and morbid adult obesity identifies three new risk loci in European populations. *Nature Genetics*. <https://doi.org/10.1038/ng.301>
- Morton, G. J., Cummings, D. E., Baskin, D. G., Barsh, G. S., & Schwartz, M. W. (2006). Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*, *443*(7109), 289–295. <https://doi.org/10.1038/nature05026>
- O’Rahilly, S., Farooqi, I. S., Yeo, G. S. H., & Challis, B. G. (2003). Minireview: Human Obesity—Lessons from Monogenic Disorders. *Endocrinology*, *144*(9), 3757–3764. <https://doi.org/10.1210/en.2003-0373>
- Ogden, C. L., Yanovski, S. Z., Carroll, M. D., & Flegal, K. M. (2007). The Epidemiology of Obesity. *Gastroenterology*, *132*(6), 2087–2102. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.03.052>
- Organization, W. H. (2018). Obesity and overweight. Recuperado el 1 de octubre de 2019, de <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- Orlov, S. (2019). *Membrane Transporters in the Pathogenesis of Cardiovascular and Lung Disorders* (1st ed.; S. Orlov, Ed.). Academic Press.
- Özbalci, C., Storck, E. M., & Eggert, U. S. (2019). RNAi Transfection Results in Lipidome Changes. *PROTEOMICS*, 1800298. <https://doi.org/10.1002/pmic.201800298>
- Pagliassotti, M. J., Gayles, E. C., & Hill, J. O. (1997). Fat and Energy Balance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *827*(1 Lipids and Sy), 431–448.

- <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1997.tb51853.x>
- Parton, L. E., Ye, C. P., Coppari, R., Enriori, P. J., Choi, B., Zhang, C.-Y., ... Lowell, B. B. (2007). Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. *Nature*, *449*(7159), 228–232. <https://doi.org/10.1038/nature06098>
- Perez-Torrado, R., Yamada, D., & Defossez, P.-A. (2006). Born to bind: the BTB protein–protein interaction domain. *BioEssays*, *28*(12), 1194–1202. <https://doi.org/10.1002/bies.20500>
- Pirone, L., Smaldone, G., Spinelli, R., Barberisi, M., Beguinot, F., Vitagliano, L., ... Pedone, E. (2019). KCTD1: A novel modulator of adipogenesis through the interaction with the transcription factor AP2 α . *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1864*(12), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2019.08.010>
- Qi, M. (2014). Transplantation of Encapsulated Pancreatic Islets as a Treatment for Patients with Type 1 Diabetes Mellitus. *Advances in Medicine*, *2014*, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2014/429710>
- Ramírez, S., Gómez-Valadés, A. G., Schneeberger, M., Varela, L., Haddad-Tóvolli, R., Altirriba, J., ... Claret, M. (2017). Mitochondrial Dynamics Mediated by Mitofusin 1 Is Required for POMC Neuron Glucose-Sensing and Insulin Release Control. *Cell Metabolism*, *25*(6), 1390-1399.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.05.010>
- Rentería, I. B. (2015). Diabetes, obesidad y síndrome metabólico: Un abordaje multidisciplinario. En *Diabetes, obesidad y síndrome metabólico: Un abordaje multidisciplinario* (1a ed., p. 347). Manual Moderno.
- Robiou-du-Pont, S., Bonnefond, A., Yengo, L., Vaillant, E., Lobbens, S., Durand, E., ... Meyre, D. (2013). Contribution of 24 obesity-associated genetic variants to insulin resistance, pancreatic beta-cell function and type 2 diabetes risk in the French population. *International Journal of Obesity*, *37*(7), 980–985. <https://doi.org/10.1038/ijo.2012.175>
- Röder, P. V., Wong, X., Hong, W., & Han, W. (2016). Molecular regulation of insulin granule biogenesis and exocytosis. *Biochemical Journal*, *473*(18), 2737–2756. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160291>

- Rorsman, P., & Renstrom, E. (2003). Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia*, *46*(8), 1029–1045. <https://doi.org/10.1007/s00125-003-1153-1>
- Rtveladze, K., Marsh, T., Barquera, S., Sanchez Romero, L. M. ari., Levy, D., Melendez, G., ... Brown, M. (2014). Obesity prevalence in Mexico: impact on health and economic burden. *Public Health Nutrition*, *17*(1), 233–239. <https://doi.org/10.1017/S1368980013000086>
- Schwartz, M. W., Guyenet, S. J., & Cirulli, V. (2010). The Hypothalamus and -Cell Connection in the Gene-Targeting Era. *Diabetes*, *59*(12), 2991–2993. <https://doi.org/10.2337/db10-1149>
- Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D., Seeley, R. J., & Baskin, D. G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature*, *404*(6778), 661–671. <https://doi.org/10.1038/35007534>
- Schwede, T. (2020). KCTD15_HUMAN Q96SI1 BTB/POZ domain-containing protein KCTD15. Recuperado el 10 de septiembre de 2020, de Swiss Institute of Bioinformatics website: <https://swissmodel.expasy.org/interactive/8WeBmw/models/>
- Skoblov, M., Marakhonov, A., Marakasova, E., Guskova, A., Chandhoke, V., Birerdinc, A., & Baranova, A. (2013). Protein partners of KCTD proteins provide insights about their functional roles in cell differentiation and vertebrate development. *BioEssays*, *35*(7), 586–596. <https://doi.org/10.1002/bies.201300002>
- Smaldone, G., Pirone, L., Capolupo, A., Vitagliano, L., Monti, M. C., Di Gaetano, S., & Pedone, E. (2018). The essential player in adipogenesis GRP78 is a novel KCTD15 interactor. *International Journal of Biological Macromolecules*, *115*, 469–475. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.078>
- Swiss-Prot, U. /. (2020). UniProtKB - Q96SI1 (KCD15_HUMAN). Recuperado el 13 de agosto de 2020, de <https://www.uniprot.org/uniprot/Q96SI1>
- Takahashi, C., Suzuki, T., Nishida, E., & Kusakabe, M. (2012). Identification and characterization of *Xenopus kctd15*, an ectodermal gene repressed by the FGF pathway. *International Journal of Developmental Biology*, *56*(5), 393–402. <https://doi.org/10.1387/ijdb.113333ct>

- Teng, X., Aouacheria, A., Lionnard, L., Metz, K. A., Soane, L., Kamiya, A., & Hardwick, J. M. (2019). KCTD: A new gene family involved in neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders. *CNS Neuroscience and Therapeutics*, 25(7), 887–902. <https://doi.org/10.1111/cns.13156>
- The Human Protein Atlas. (2020). Cell atlas - KCTD15. Recuperado el 10 de septiembre de 2020, de <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000153885-KCTD15/cell>
- Thorleifsson, G., Walters, G. B., Gudbjartsson, D. F., Steinthorsdottir, V., Sulem, P., Helgadóttir, A., ... Stefansson, K. (2009). Genome-wide association yields new sequence variants at seven loci that associate with measures of obesity. *Nature Genetics*, 41(1), 18–24. <https://doi.org/10.1038/ng.274>
- UniProtKB, T. (2020). UniProtKB - B5DF44 (B5DF44_RAT). Recuperado el 13 de agosto de 2020, de <https://www.uniprot.org/uniprot/B5DF44>
- University of California Santa Cruz Genomics Institute. (2019). UCSC Genome Browser on Human Dec. 2013 (GRCh38/hg38) Assembly. Recuperado el 10 de septiembre de 2020, de https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg38&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr19%3A33796862-33813472&hgsid=895095911_CW5kF5VsybixUQjpt7QETZg6UiDi
- University of California Santa Cruz Genomics Institute. (2020). UCSC Genome Browser on Rat Jul. 2014 (RGSC 6.0/rn6) Assembly. Recuperado el 10 de septiembre de 2020, de https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgc?hgsid=895119181_aR0PoFrVYLOY60BHsdbcL0WArYuo&c=chr1&l=90506696&r=90520012&o=90506696&t=90520012&g=ncbiRefSeqCurated&i=NM_001109141.1
- Usman, H., & Mathew, M. (2010). Potassium channel regulator KCNRG regulates surface expression of Shaker-type potassium channels. *Biochem Biophys Res Commun.*, 391(3), 1301–1305. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.11.143>
- Varela, L., & Horvath, T. L. (2012). Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis. *EMBO reports*, 13(12), 1079–1086. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.174>
- Velasco-Contreras, M. E. (2016). Evolución de la epidemia de diabetes mellitus tipo

- 2 en población derechohabiente del IMSS. *Evolution of the Type 2 Diabetes Mellitus epidemic in insured population at the IMSS.*, 54(4), 490–503. Recuperado de <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=ip,url,uid,cookie&db=a9h&AN=116392013&lang=es&site=ehost-live>
- WHO. (1998). Consultation on Obesity: Preventing and managing the global epidemic. En *Geneva: World Health Organization*. <https://doi.org/10.1186/14752875199700001>
- Widberg, C. H., Newell, F. S., Bachmann, A. W., Ramnoruth, S. N., Spelta, M. C., Whitehead, J. P., ... Prins, J. B. (2009). Fibroblast growth factor receptor 1 is a key regulator of early adipogenic events in human preadipocytes. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 296(1), E121–E131. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90602.2008>
- Willer, C. J., Speliotes, E. K., Loos, R. J. F., Li, S., Lindgren, C. M., Heid, I. M., ... Hirschhorn, J. N. (2009). Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation. *Nature Genetics*, 41(1), 25–34. <https://doi.org/10.1038/ng.287>
- Williams, M. J., Goergen, P., Rajendran, J., Zheleznyakova, G., Hägglund, M. G., Perland, E., ... Schiöth, H. B. (2014). Obesity-Linked Homologues TfAP-2 and Twz Establish Meal Frequency in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genetics*, 10(9), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004499>
- Xi, B., Zhao, X., Shen, Y., Wu, L., Hou, D., Cheng, H., & Mi, J. (2014). An obesity genetic risk score predicts risk of insulin resistance among Chinese children. *Endocrine*, 47(3), 825–832. <https://doi.org/10.1007/s12020-014-0217-y>
- Xu, Jianchao. (2003). The voltage-gated potassium channel Kv1.3 regulates energy homeostasis and body weight. *Human Molecular Genetics*, 12(5), 551–559. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg049>
- Xu, Jianchao, Wang, P., Li, Y., Li, G., Kaczmarek, L. K., Wu, Y., ... Desir, G. V. (2004). The voltage-gated potassium channel Kv1.3 regulates peripheral insulin sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(9), 3112–3117. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308450100>
- Xu, Jing, Zhao, X., Yang, Y., Zhang, K., Wang, M., & Xu, Z. (2020). KCTD15 Gene Expression Regulates Adipocyte Differentiation and Is Associated with Obesity

- in Humans. *BMC Endocrine Disorders*, 1–19.
<https://doi.org/10.21203/rs.2.24498/v2>
- Yengo, L., Sidorenko, J., Kemper, K. E., Zheng, Z., Wood, A. R., Weedon, M. N., ... Visscher, P. M. (2018). Meta-analysis of genome-wide association studies for height and body mass index in ~700 000 individuals of European ancestry. *Human Molecular Genetics*, 27(20), 3641–3649.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddy271>
- Yoganathan, P., Karunakaran, S., Ho, M. M., & Clee, S. M. (2012). Nutritional regulation of genome-wide association obesity genes in a tissue-dependent manner. *Nutrition & Metabolism*, 9(1), 65. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-9-65>
- Zarelli, V. E., & Dawid, I. B. (2013). The BTB-Containing Protein Kctd15 Is SUMOylated In Vivo. *PLoS ONE*, 8(9), e75016.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075016>