



UNIVERSIDA NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
I Z T A C A L A

*“EXPRESIÓN DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES CATALASA Y  
Mn- SUPEROXIDO DISMUTASA REGULADAS POR TESTOSTERONA EN  
ISLOTES PANCREÁTICOS DE RATA CON DAÑO TEMPRANO POR STZ”.*

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIOLOGO

P R E S E N T A

TONANTZIN CITLALI SOSA LARIOS

MEXICO.D.F.

2008

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉXICO



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.

El presente trabajo fue realizado en el departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Nutrición “Salvador Zubirán”, bajo la dirección de la Dra. Lydia Sumiko Morimoto Martínez, con el apoyo del proyecto de CONACYT 52155-Q

## AGRADECIMIENTOS

Mi reconocimiento a la Dra. Lydia Sumiko Morimoto Martínez. Directora de la Tesis por su orientación, colaboración, sugerencias y por su gran paciencia, apoyo y comprensión durante el desarrollo de este trabajo.

M. en C. Alberto Rojas Ochoa por su adiestramiento técnico en el aislamiento de islotes pancreáticos, la extracción de RNA y RT-PCR, ya que tales metodologías fueron fundamentales para la obtención de resultados de esta tesis.

Roberto Chavira por facilitarnos su equipo de trabajo.

Eulises. Por proporcionarnos su Kit de insulina

Vet. Octavio Villanueva por su constante asesoramiento en el Bioterio.

A las personas que convivieron conmigo en el laboratorio y que hicieron más grata mi estancia en el INCNSZ. Lupita, David, Don Luís y Quetíta.

Revisores de Tesis por sus valiosas aportaciones en la corrección y enriquecimiento de este trabajo.

DR. Martín Palomar Morales

M en C Martín Martínez Torres

M en C Mario Cárdenas León

Biol. Alonso Vilches Flores

M.C. Víctor Ramón Moreno Torres

Por sus consejos y gran ayuda en diferentes momentos de la carrera.

Biol. Luís Antonio

Por su constante asesoramiento académico

A mis compañeros de FES Iztacala

Laura Fernández.

Que maravilloso fue ese instante en que te descubrí como amiga.

Gustavo, Mariela, Marcos, Poot, Alejandra.

Por compartir conmigo pequeños instantes y brindarme su amistad.

## Esta Tesis Esta Dedicada

Al Maestro Samuel Joaquin F.

Por su motivación constante a ser mejor.

A mi Madre:María de los Angeles.

Por su apoyo incondicional y su esfuerzo por sacarme adelante.

A mi Hija Libni

Que me acompañe en el trabajo experimental y quien me ha enseñado a jamás darme por vencida sin importar cuanto trabajo cueste conseguir lo que se quiere.

A mis hermanos:

Javier, Xilonen, Mario, David y Angel que me ayudaron a seguir adelante.

A Isaac por ser parte de mi vida

## **INDICE**

<b>INTRODUCCIÓN</b>	9
Estrés oxidativo	11
Especies reactivas de Oxígeno	11
Especies reactivas de oxígeno como segundos mensajeros	11
Efectos del estrés oxidativo	12
Mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo	16
Características de las enzimas antioxidantes	16
Las Hormonas Esteroides	17
El páncreas	20
Efecto de las hormonas esteroides en el Páncreas	20
Estrés oxidativo en el Islote	22
<b>HIPÓTESIS</b>	24
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	24
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	24
<i>Modelo in vivo</i>	24
Aislamiento y Cultivo de islotes Pancreáticos	25
<i>Modelo in Vitro</i>	25
Cuantificación de insulina	26
Tiempo y concentración de STZ	26

Aislamiento y Tratamientos de islotes	26
Extracción de RNA de islotes	27
RT-PCR	28
Análisis de los productos de PCR	29
<b>RESULTADOS</b>	29
<i>Modelo in vivo</i>	29
<i>Modelo in vitro</i>	30
<i>Viabilidad de islotes</i>	30
<i>Tiempo y concentración de STZ</i>	30
<i>Análisis de Apoptosis en islotes tratados con STZ</i>	31
<i>Expresión de enzimas antioxidantes CAT y Mn- SOD</i>	32
<i>Secreción de Insulina</i>	35
<b>DISCUSIÓN</b>	42
<b>CONCLUSIONES</b>	42
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	43
<b>APÉNDICES</b>	48
Apéndice 1	48
Apéndice 2	49
Apéndice 3	51
Apéndice 4	54
Apéndice 5	55



## RESUMEN

El estrés oxidativo es un estado de la célula en el cual se encuentra alterada la oxidoreducción intracelular, es decir, el balance entre prooxidantes y antioxidantes. Este desbalance se da a causa de una excesiva producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y por deficiencia en los mecanismos antioxidantes, lo que conducen a daño celular. Las células de mamíferos han desarrollado sistemas de protección para minimizar el daño resultante de la biotransformación de productos oxidativos normales del metabolismo celular a través de enzimas antioxidantes como la catalasa, la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa. Entre otros factores que participan modificando la respuesta al estrés oxidativo, ya sea induciendo la expresión de ciertos genes protectores o incrementando la expresión de enzimas antioxidantes, se encuentran los esteroides sexuales. El presente estudio tuvo como objetivo estudiar el efecto de la testosterona sobre la expresión de las enzimas catalasa (CAT) y manganeso superóxido dismutasa (Mn-SOD) en islotes pancreáticos de rata con daño temprano por estreptozotocina (STZ). Ratas macho de la cepa Wistar se inyectaron con una dosis única de STZ 60 mg/kg de peso y posteriormente se realizó la extracción de islotes pancreáticos a varios tiempos después de la inyección. Además, se trabajó con un modelo *in vitro* se obtuvieron islotes pancreáticos de ratas macho de la misma cepa por el método de digestión con colagenasa y una vez obtenidos los islotes se realizaron los siguientes tratamientos; control (C) a los que se les administró el vehículo, testosterona + STZ (T+STZ), testosterona (T), estreptozotocina (STZ), utilizando tres diferentes concentraciones de testosterona. Posteriormente se analizó la expresión de las enzimas por la técnica de RT-PCR (Retrotranscripción-Reacción en cadena de la Polimerasa). Además se cuantificó la secreción de insulina liberada al medio durante los tratamientos por el método de RIA (radioinmunoanálisis). Se encontró que la testosterona tiene un efecto positivo en la expresión de la enzima Mn-SOD, efecto que

depende de la concentración de testosterona, así mismo se observó, que la sobre-expresión de esta enzima puede proteger a los islotes pancreáticos del estrés oxidativo, previniendo la apoptosis inducida por la administración de STZ. La enzima catalasa no presenta cambios en su expresión a diferentes concentraciones de testosterona. En cuanto a la secreción de insulina no se observaron diferencias significativas con las distintas concentraciones de testosterona empleadas. En conclusión, la testosterona incrementa la expresión de la enzima Mn-SOD y esta a su vez ayuda a proteger a los islotes pancreáticos de rata del estrés oxidativo producido por la STZ. Por otro lado la expresión de la enzima catalasa no se modificó por efecto de este andrógeno.

## **INTRODUCCIÓN.**

### **Estrés oxidativo**

El estrés oxidativo es un estado de la célula en el cual se encuentra alterada la oxidoreducción intracelular, es decir el balance entre prooxidantes y antioxidantes. Este desbalance se da, a causa de una excesiva producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y/o por deficiencia en los mecanismos antioxidantes, lo que conduce a daño celular (Gutteridge y Halliwell, 1999).

### **Especies reactivas de Oxígeno**

El oxígeno es necesario para la vida, pero en determinadas condiciones ya sea por reacciones de naturaleza química, por acción enzimática, por efecto de las radiaciones ionizantes o por otras causas, pueden producirse una serie de ROS, capaces de reaccionar con otros compuestos presentes en el organismo y, consecuentemente, llegar a producir un daño celular. Un radical libre (RL) es aquella estructura química, cargada o no, que tiene en su estructura al menos un electrón desapareado en su última órbita. Los RL tienen una vida media muy corta, debido a que son muy inestables y tienden a aparearse robando electrones de las biomoléculas de la célula.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se pueden generar a nivel intra o extracelular. Las fuentes de ROS intracelulares son el transporte de electrones mitocondrial, las reacciones del complejo citocromo P450, (metabolismo de xenobióticos), el metabolismo de ácidos grasos en los peroxisomas, la NADPH oxidasa de membrana (especialmente en células inflamatorias), los subproductos de reacciones enzimáticas (xantina oxidasa) y las células fagocíticas. Las fuentes de radicales libres extracelulares son el humo del cigarro, la luz solar, la oxidación de drogas, las radiaciones ionizante, el shock térmico y las sustancias cíclicas de naturaleza redox entre otros (Gamaley, 1999).

Las especies reactivas de oxígeno más importantes son:

- ❖ Anión superóxido  $\text{O}_2^-$
- ❖ Peroxido de hidrógeno  $\text{H}_2\text{O}_2$
- ❖ Radicales hidroxilo  $\bullet\text{OH}$
- ❖ oxígeno singulete (simple)  $^1\text{O}_2$

### **Especies reactivas de oxígeno como segundos mensajeros**

Los ROS no son sólo producidos como agentes citotóxicos por células especializadas en condiciones patológicas, sino también se generan en cada tipo celular como subproductos de las reacciones de transferencia electrónica. La mitocondria es la fuente principal de formación del radical superóxido, que se difunde rápidamente por la célula hasta que encuentra una reacción apropiada. Este radical se origina por transferencia de un electrón al oxígeno molecular. Para la eliminación rápida del superóxido, la mitocondria contiene su propia superóxido dismutasa, sistema enzimático inducible, dependiente de manganeso (Cascales, 1999).

Diversos tipos de ROS, como peroxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), radical hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ) y oxígeno *singulete* ( $^1\text{O}_2$ ), pueden reaccionar entre ellos en presencia de metales como el cobre o el hierro y también dar lugar a productos reactivos secundarios como peróxidos lipídicos e hipoclorito (Cascales, 1999).

Todas las células aerobias producen constitutivamente radicales de oxígeno, y pequeñas cantidades de estos radicales se liberan por varios tipos celulares cuando son estimulados por el factor de necrosis tumoral (TNF por sus siglas en inglés) la interleucina 1 (IL-1) y los ésteres del forbol. Todos ellos activan una forma citoplasmática del factor de transcripción NFkB que resulta al eliminar una subunidad proteica inhibidora. Esta activación se inhibe por agentes que eliminan radicales de

oxígeno y puede recuperarse mediante exposición a un estrés oxidativo débil. Cada tipo celular genera especies reactivas de oxígeno de forma constitutiva, que en determinados casos, pueden producirse en cantidad suficiente como para llegar a ser tóxicas.

El TNF puede inducir la síntesis de otras citocinas en linfocitos T y en macrófagos, activando los genes respectivos. Sin embargo, es citotóxica sobre otras líneas celulares no linfoides. Esta citotoxicidad depende, al menos en parte, de las ROS porque la sobre-expresión de la superóxido dismutasa (SOD) y la disminución de la presión parcial de oxígeno protegen a estas células de los efectos citotóxicos del TNF. La unión del TNF a su receptor, así como también del forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) y la IL1 inducen la síntesis de especies reactivas de oxígeno, lo cual demuestra que la concentración intracelular de estas especies se eleva durante la estimulación fisiológica de las células por las citocinas. Los radicales de oxígeno nos llevan a considerarlos como segundos mensajeros ya que su concentración se eleva por acción de un ligando extracelular y existe una reacción intracelular de transducción de señales que es provocada específicamente por los radicales de oxígeno. La forma citoplasmática del factor de transcripción inducible, el NFkB, es un objetivo fisiológico importante para las ROS (Cascales, 1999).

### **Efectos del estrés oxidativo**

Cuando las especies reactivas oxidantes superan las defensas antioxidantes se produce el estrés oxidativo, y ocurre el daño a macromoléculas. El posible destino celular bajo condiciones de estrés dependerá de varios factores como el contenido endógeno de defensas antioxidantes, el grado de estimulación de las mismas bajo la condición de estrés, la reversibilidad de las modificaciones a macromoléculas producidas, la magnitud del estrés oxidativo, etc.

Los compuestos celulares más sensibles a los efectos de estos oxidantes son:

- Las proteínas
- Los lípidos insaturados
- Los ácidos nucleicos
- Los carbohidratos

*Proteínas.* Las proteínas, son modificadas de diferentes formas por las ROS. Estas pueden reaccionar directamente con el ligando metálico de muchas metaloproteínas. Se ha comprobado que el hierro de la hemoglobina puede reaccionar con el radical superóxido o el peróxido de hidrógeno para formar metahemoglobina. Otra importante hemoproteína citoplasmática, la catalasa, es inhibida por el  $O_2^-$ , que se convierte en sus formas inactivas ferroxí y ferrilo. Por último, el peróxido de hidrógeno, también puede reducir el  $Cu^{2+}$  de la SOD Cu/Zn a  $Cu^{1+}$ , reaccionando después con él y generando un radical hidroxilo. A su vez este radical hidroxilo, ataca un residuo adyacente de histidina del centro activo del enzima, necesario para la actividad catalítica (Gamaley, 1999).

Debido a la reactividad de los radicales libres con las moléculas insaturadas o que contienen azufre, las proteínas con proporciones elevadas de Trp, Tyr, Phe, His, Met y Cys pueden sufrir modificaciones de aminoácidos mediadas por radicales libres. En este sentido se ha observado que enzimas tales como la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa o la superóxido dismutasa, que dependen de estos aminoácidos para su actividad, se inhiben en presencia de radicales libres. Las reacciones de los radicales libres con estos aminoácidos dan lugar también a alteraciones estructurales en las proteínas provocando entrecruzamientos y fenómenos de agregación, que se ven favorecidos por la formación de puentes disulfuro intra e intermoleculares (Gamaley, 1999).

*Lípidos.* Los radicales libres hidroxilo e hidroperoxilo pueden reaccionar con los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos y de otros componentes lipídicos de las membranas para formar hidroperóxidos que pueden alterar la estructura y función de las membranas. Los ácidos grasos de las membranas celulares son muy vulnerables a los ataques oxidativos por las ROS, puesto que contienen grupos metileno separados por dobles enlaces y los ROS debilitan el enlace C-H.

*Ácidos nucleicos.* Los ácidos nucleicos también pueden ser atacados por los radicales libres. La citotoxicidad de estas especies químicas, en gran parte, es una consecuencia de las aberraciones cromosómicas producidas por las modificaciones químicas que sufren las bases y los azúcares del DNA al reaccionar con los radicales libres, especialmente con el radical hidroxilo, con consecuencias similares a las de los agentes carcinógenos. Las modificaciones químicas de los nucleótidos provocan, en muchos casos, la ruptura de las hebras del DNA. Si el daño que se origina es tan grande que no puede ser reparado, se produce una o varias mutaciones y la célula entra en apoptosis.

*Carbohidratos.* Los carbohidratos son dañados por los radicales libres en menor proporción que otras moléculas. Azúcares tales como glucosa, manitol o ciertos desoxiazúcares pueden reaccionar con el radical hidroxilo para producir sustancias reactivas. Asimismo, los polisacáridos pueden sufrir el ataque de los radicales libres, en este caso, fragmentándose a unidades más sencillas (despolimerización del ácido hialurónico) (Gamaley, 1999).

## **Mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo**

Las células de mamíferos han desarrollado sistemas de protección para minimizar el daño resultante de la biotransformación de xenobióticos y productos oxidativos normales del metabolismo celular. Existen al menos cuatro mecanismos que contribuyen a aminorar los efectos perjudiciales de estos oxidantes en la célula. Los tres primeros son enzimáticos y se describen a continuación.

### **Características de las enzimas antioxidantes**

Los antioxidantes son un grupo de vitaminas, minerales y enzimas que protegen al cuerpo de la formación de radicales libres, principalmente tres enzimas los neutralizan en el organismo naturalmente y se describen a continuación.

*Catalasa (CAT)*. Tiene una amplia distribución en el organismo, y se encuentra en una alta concentración en el hígado y riñón, una concentración baja en tejido conectivo, epitelios e islotes pancreáticos, y prácticamente nula en tejido nervioso. Se localiza a nivel celular en: mitocondrias, peroxisomas, citosol (eritrocitos); presenta dos funciones: catalítica y peroxidativa, y forma parte del sistema antioxidante CAT/SOD que actúa en presencia de altas concentraciones de peróxido de hidrógeno.

*Superóxido dismutasa (SOD)*. Su distribución es amplia en el organismo, está formada por un grupo de enzimas metaloides: Cu-SOD y Zn-SOD: contienen cobre y zinc en su sitio activo y se encuentran en el citosol y en el espacio inter-membranoso mitocondrial, Mn-SOD: contiene manganeso y se localiza en la matriz mitocondrial. Estas enzimas dismutan el oxígeno para formar peróxido de hidrógeno y su principal función es la protección contra el anión superóxido (Venereo, 2002).



*Glutación peroxidasa (GPx)*. Es una enzima selenio dependiente, cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno a lipoperóxido (L-OOH), usa como agente reductor el glutati3n reducido (GSH) y se localiza en: citosol (eritrocitos), lisosomas (neutr3filos, macr3fagos y otras c3lulas del sistema inmune). Existen tres formas de GPx: GPx-c o forma celular: tiene mayor afinidad por el per3xido de hidr3geno que por el lipoper3xido; GPx-p o forma extracelular: presenta afinidad semejante para ambos sustratos; GPx-PH tiene afinidad espec3fica para los lipoper3xidos.

El cuarto mecanismo antioxidante no es enzimático y proviene de diversos compuestos naturales que tienen la capacidad de reaccionar con los radicales libres sin generar nuevos radicales. Algunos ejemplos son el  $\alpha$  tocoferol (vitamina E), el 3cido asc3rbico (vitamina C), selenio, el  $\beta$ -caroteno (vitamina A) y la ubiquinona (Coenzima Q 10) (Venereo 2002).

### **Las Hormonas Esteroides**

Existen otros factores que participan modificando la respuesta al estr3s oxidativo, ya sea induciendo la expresi3n de ciertos genes protectores o incrementando la expresi3n de enzimas antioxidantes, tal es el caso de las hormonas esteroides.

Las hormonas esteroides se sintetizan a partir del colesterol en gl3ndulas endocrinas especializadas como la corteza de las gl3ndulas suprarrenales, el ovario y el test3culo. Sus efectos sobre sus 3rganos blanco van desde la participaci3n en la regulaci3n del desarrollo, la diferenciaci3n celular y la respuesta fisiol3gica a diversos est3mulos. Para producir estos efectos las hormonas esteroides penetran a la c3lula por difusi3n pasiva, dentro de ella son reconocidas por prote3nas receptoras citopl3smicas o

nucleares específicas. Los receptores a hormonas esteroideas pertenecen a una superfamilia de factores de transcripción inducibles por su ligando, comprenden receptores para ácido retinóico, hormonas tiroideas y varios genes para los que su ligando fisiológico no es conocido aún. Estos receptores están organizados estructuralmente en diferentes regiones o dominios. Contienen una región amino-terminal (I) que participa en la regulación de la transcripción; un dominio de unión al DNA (II) de 66 a 68 aminoácidos, una región bisagra (III) y un dominio de unión a la hormona (IV). El dominio de unión al DNA (II y III) es una región altamente conservada entre los miembros de esta familia. Este dominio tiene 2 regiones CI y CII parecidas a dedos de zinc, dichas estructuras se doblan para formar una sola región que asemeja a la conformación de las proteínas hélice-giro-hélice que constituyen factores transcripcionales. La región carboxilo terminal comprende aproximadamente 250aa y corresponde al dominio de unión a la hormona (IV). Dentro de esta región se han identificado sub-regiones específicas responsables de la actividad transcripcional o TAF (por sus siglas en inglés transcriptional activating function), estas regiones son muy parecidas a los dominios acídicos de activación de ciertos factores de transcripción. La región III, situada entre las regiones de unión al DNA y de unión a la hormona, es rica en aminoácidos básicos y aunque no es un dominio altamente conservado, es similar a la secuencia de translocación nuclear del antígeno T del virus SV40 (Landers y Spelberg, 1992).

El mecanismo por el cual los esteroideas regulan la expresión de genes responsivos, se presenta después de la unión de la hormona a su receptor específico, esta unión resulta en un cambio conformacional del receptor, que aumenta su afinidad por el DNA. El complejo hormona-receptor se une en forma de dímero (homodimero u heterodimero) a una secuencia de reconocimiento en la proximidad del gen regulado, dichas secuencias son los elementos de respuesta a hormonas (ERH) en donde se

puede activar o reprimir la transcripción (Yamamoto, 1988; Beato, 1988; Schmitd et al. 1989, Carson-Jurica et al.1990, Landers y Spelberg, 1992).

Con relación al papel de las hormonas esteroides en el estrés oxidativo, el grupo de Acevedo (2001) encontró que la actividad de la enzima glutatión peroxidasa en macrófagos no muestra diferencias entre ratas machos y hembras, sin embargo la actividad de la SOD y CAT es marcadamente superior en hembras que en machos siendo esta de 180 y 86 % respectivamente. La castración en machos no modifica significativamente la actividad enzimática antioxidante, en hembras la ovariectomía no afectó la expresión de SOD y GSH-Px, sin embargo la actividad de la CAT se redujo marcadamente en un 48 %, al suplementar a los sujetos con estrógenos, la actividad enzimática de la CAT regresó a los niveles iniciales ya que el estradiol es un potente regulador de esta enzima.

Tam (2003) indujo estrés oxidativo en el epitelio acinar de la próstata ventral de rata mediante la castración y utilizando la técnica de RT-PCR en tiempo real, encontró que la enzima Mn-SOD se reduce relativamente después de la castración y al suplementar a los animales castrados con testosterona, los niveles de la enzima se normalizan, por lo que concluyen que la Mn-SOD esta regulada directamente por andrógenos en la próstata ventral de la rata, mientras que la SOD citosólica no se modificó por efecto de la castración ni de la testosterona. Por otro lado la CAT fue insensible a la castración, sin embargo al sustituir exógenamente a las ratas con testosterona esta enzima se sobre expresa ~220% comparada con el control.

## **El páncreas**

El páncreas es una glándula de secreción mixta con funciones exocrinas y endocrinas; la secreción exocrina es el jugo pancreático rico en enzimas digestivas que pasan al duodeno a través de los conductos pancreáticos. Las funciones endocrinas se llevan a cabo por los islotes de Langerhans que segregan distintas hormonas y varios péptidos reguladores. Se conocen cuatro tipos celulares; las células  $\beta$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$  y PP productoras de insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático respectivamente (Tresguerres, 1992).

La insulina estimula los procesos anabólicos e inhibe los catabólicos, así mismo favorece la síntesis del glucógeno e interviene en el crecimiento celular inhibiendo la proteólisis. El glucagón estimula los procesos catabólicos e inhibe los procesos anabólicos, por otra parte la somatostatina actúa como un regulador paracrino y/o un inhibidor de la secreción de diferentes hormonas. El polipéptido pancreático es secretado por la estimulación de ingestión de proteínas (Tresguerres, 1992).

## **Efecto de las hormonas esteroides en el Páncreas**

Las hormonas esteroides regulan algunas de las actividades secretoras del páncreas. Con respecto a la función exocrina, se ha demostrado que en el modelo de ratas gonadectomizadas, hay una disminución en los gránulos de zimógeno y por ende una marcada disminución en la secreción pancreática.

En cuanto a la función endocrina, la progesterona estimula la proliferación de las células  $\alpha$  y  $\beta$  e induce la secreción de insulina. Los efectos de los andrógenos en la función endocrina también han sido estudiados en su relación con la síntesis y

liberación de la insulina. En modelos experimentales de ratas macho gonadectomizadas (para suprimir la producción endógena de testosterona) y en animales gonadectomizados y sustituidos con dosis farmacológicas del andrógeno, se ha demostrado que la testosterona regula positivamente la expresión del gene de la insulina y que existe un efecto trófico sobre las células pancreáticas (Morales, 2007).

Morimoto *et al.* (2005) reportaron el efecto de protector de la testosterona en las células  $\beta$  del páncreas en ratas tratadas con estreptozotocina (STZ), un agente diabético. Se demostró que la apoptosis de las células  $\beta$  se incrementaba significativamente en las ratas castradas con respecto a las intactas y el efecto se revertía cuando se suplementaba a las ratas castradas con una dosis farmacológica de testosterona.

Estudios funcionales sugieren que los esteroides sexuales pueden influenciar directamente y/o indirectamente en la función de los islotes en animales normales. Se ha encontrado que los esteroides actúan directamente en las células  $\beta$  a través de receptores específicos. Se ha encontrado un efecto opuesto entre andrógenos y estrógenos en la sensibilidad de las células  $\beta$  a la acción de la insulina, ya que los andrógenos la disminuyen mientras que los estrógenos la incrementan (Rosmalen *et al.* 2001).

Estudios recientes realizados en ratones transgénicos han demostrado efecto protector de estradiol sobre las células  $\beta$  pancreáticas, previniendo la diabetes (Le May *et al.* 2006).

## **Estrés oxidativo en el Islote**

El islote pancreático posee una baja defensa antioxidante, por esta razón es muy susceptible al daño por sustancias tóxicas, debido a que la expresión de enzimas antioxidantes como SOD, CAT, Y GPx, es baja en células de islotes en comparación con otros tejidos (Kaneto, 1999; Srinivasan, 2003).

Las ROS juegan un papel importante en la patogénesis y desarrollo de complicaciones de la diabetes. Las ROS son producidas principalmente por la reacción de la glicación la cual ocurre en varios tejidos incluyendo a las células  $\beta$  bajo las condiciones del paciente diabético.

Estudios recientes han mostrado que la apoptosis de las células beta y la transcripción del gen de insulina son reducidos por la glicación mediante las ROS.

El tratamiento con enzimas antioxidantes suprime la apoptosis y conserva la función de las células  $\beta$  como fue demostrado en ratones diabéticos (Tiedge, 1998; Kaneto et al. 1999; Srinivasan, 2003; Friesen, 2004).

La estreptozotocina (STZ) es un agente diabético que produce radicales libres y (ON) óxido nítrico durante su metabolismo, el ON es producido por la oxidación de L-arginina y L- citrulina, el exceso de ON produce inhibición del metabolismo mitocondrial, modificación de la proteínas y del DNA, que podría conducir al daño en la secreción de insulina y a la apoptosis de las células  $\beta$ . La inducción del ON es regulada por un factor de transcripción que se une a sitios específicos en el promotor del gen de la óxido nítrico sintasa (ONS) (Kang-Beom et al. 2006). Sin embargo los resultados de varios experimentos proporcionan la evidencia que el ON no es la única molécula responsable del efecto citotóxico de la STZ. Se ha encontrado que la STZ

genera especies reactivas de oxígeno que también contribuyen a la fragmentación del DNA y evocan otros cambios deletéreos en las células (Szkudelski, 2001).

Nobuyuki *et al.* (1991) en estudios *in vivo* e *in vitro* con islotes pancreáticos de rata, demostraron que la STZ estimula la generación de  $H_2O_2$  induciendo la fragmentación del DNA y la destrucción de las células  $\beta$ . A una dosis de 1 mM de STZ, el DNA se fragmento completamente. Además se reportó que la acción de la STZ en las células  $\beta$  es acompañada por la alteración de insulina en la sangre y en la concentración de glucosa. El mecanismo por el cual se propone que la STZ induce la muerte de las células  $\beta$  fue por alquilación del ADN (Szkudelski, 2001).

Laybutt *et al.* (2002), realizaron un estudio del incremento en la expresión de genes antioxidantes y antiapoptóticos que puedan contribuir a la supervivencia de las células  $\beta$  del páncreas, durante la hiperglicemia crónica, reportando que conforme se incrementan los niveles de hiperglicemia crónica, se aumenta progresivamente la expresión de algunas enzimas como el hemo oxigenasa-1, glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa y genes antiapoptóticos como son el gen A20 y BCL-2.

Hainan *et al.* (2005) trabajando con ratones transgénicos que sobre expresan CAT o Mn-SOD, demostraron que al sobre expresarse cada una de las dos enzimas por separado, retarda significativamente el desarrollo de la diabetes inducida por STZ y al sobre expresarse las dos enzimas juntas, la protección se incrementa al doble.

Tiedge (1998) encontró que la sobre expresión de catalasa y glutatión peroxidasa en combinación, protegen a las células del estrés oxidativo en una línea celular productora de insulina sometida a diferentes ROS.

## **HIPÓTESIS**

La testosterona podría regular la expresión de enzimas CAT y Mn-SOD en islotes pancreáticos de rata con daño temprano por STZ.



## **ANTECEDENTES**

### **El páncreas**

El páncreas es una glándula de secreción mixta con funciones exocrinas y endocrinas; la secreción exocrina es el jugo pancreático rico en enzimas digestivas que pasan al duodeno a través de los conductos pancreáticos. Las funciones endocrinas se llevan a cabo por los islotes de Langerhans que segregan distintas hormonas y varios péptidos reguladores. Se conocen cuatro tipos celulares; las células  $\beta$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$  y PP productoras de insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático respectivamente (Tresguerres, 1992).

La insulina estimula los procesos anabólicos e inhibe los catabólicos, así mismo favorece la síntesis del glucógeno e interviene en el crecimiento celular inhibiendo la proteólisis. El glucagón estimula los procesos catabólicos e inhibe los procesos anabólicos, por otra parte la somatostatina actúa como un regulador paracrino y/o un inhibidor de la secreción de diferentes hormonas. El polipéptido pancreático es secretado por la estimulación de ingestión de proteínas (Tresguerres, 1992).

### **Efecto de las hormonas esteroideas en el Páncreas**

Las hormonas esteroideas regulan algunas de las actividades secretoras del páncreas. Con respecto a la función exocrina, se ha demostrado que en el modelo de ratas gonadectomizadas, hay una disminución en los gránulos de zimógeno y por ende una marcada disminución en la secreción pancreática.

En cuanto a la función endocrina, la progesterona estimula la proliferación de las células  $\alpha$  y  $\beta$  e induce la secreción de insulina. Los efectos de los andrógenos en la

función endocrina también han sido estudiados en su relación con la síntesis y liberación de la insulina. En modelos experimentales de ratas macho gonadectomizadas (para suprimir la producción endógena de testosterona) y en animales gonadectomizados y sustituidos con dosis farmacológicas del andrógeno, se ha demostrado que la testosterona regula positivamente la expresión del gene de la insulina y que existe un efecto trófico sobre las células pancreáticas (Morales, 2007).

Morimoto *et al.* (2005) reportaron el efecto de protector de la testosterona en las células  $\beta$  del páncreas en ratas tratadas con estreptozotocina (STZ), un agente diabético. Se demostró que la apoptosis de las células  $\beta$  se incrementaba significativamente en las ratas castradas con respecto a las intactas y el efecto se revertía cuando se suplementaba a las ratas castradas con una dosis farmacológica de testosterona.

Estudios funcionales sugieren que los esteroides sexuales pueden influenciar directamente y/o indirectamente en la función de los islotes en animales normales. Se ha encontrado que los esteroides actúan directamente en las células  $\beta$  a través de receptores específicos. Se ha encontrado un efecto opuesto entre andrógenos y estrógenos en la sensibilidad de las células  $\beta$  a la acción de la insulina, ya que los andrógenos la disminuyen mientras que los estrógenos la incrementan (Rosmalen *et al.* 2001).

Estudios recientes realizados en ratones transgénicos han demostrado efecto protector de estradiol sobre las células  $\beta$  pancreáticas, previniendo la diabetes (Le May *et al.* 2006).

## **Estrés oxidativo en el Islote**

El islote pancreático posee una baja defensa antioxidante, por esta razón es muy susceptible al daño por sustancias tóxicas, debido a que la expresión de enzimas antioxidantes como SOD, CAT, Y GPx, es baja en células de islotes en comparación con otros tejidos (Kaneto, 1999; Srinivasan, 2003).

Las ROS juegan un papel importante en la patogénesis y desarrollo de complicaciones de la diabetes. Las ROS son producidas principalmente por la reacción de la glicación la cual ocurre en varios tejidos incluyendo a las células  $\beta$  bajo las condiciones del paciente diabético.

Estudios recientes han mostrado que la apoptosis de las células beta y la transcripción del gen de insulina son reducidos por la glicación mediante las ROS.

El tratamiento con enzimas antioxidantes suprime la apoptosis y conserva la función de las células  $\beta$  como fue demostrado en ratones diabéticos (Tiedge, 1998; Kaneto et al. 1999; Srinivasan, 2003; Friesen, 2004).

La estreptozotocina (STZ) es un agente diabético que produce radicales libres y (ON) óxido nítrico durante su metabolismo, el ON es producido por la oxidación de L-arginina y L-citrulina, el exceso de ON produce inhibición del metabolismo mitocondrial, modificación de las proteínas y del DNA, que podría conducir al daño en la secreción de insulina y a la apoptosis de las células  $\beta$ . La inducción del ON es regulada por un factor de transcripción que se une a sitios específicos en el promotor del gen de la óxido nítrico sintasa (ONS) (Kang-Beom et al. 2006). Sin embargo los resultados de varios experimentos proporcionan la evidencia que el ON no es la única molécula responsable del efecto citotóxico de la STZ. Se ha encontrado que la STZ

genera especies reactivas de oxígeno que también contribuyen a la fragmentación del DNA y evocan otros cambios deletéreos en las células (Szkudelski, 2001).

Nobuyuki *et al.* (1991) en estudios *in vivo* e *in vitro* con islotes pancreáticos de rata, demostraron que la STZ estimula la generación de  $H_2O_2$  induciendo la fragmentación del DNA y la destrucción de las células  $\beta$ . A una dosis de 1 mM de STZ, el DNA se fragmento completamente. Además se reportó que la acción de la STZ en las células  $\beta$  es acompañada por la alteración de insulina en la sangre y en la concentración de glucosa. El mecanismo por el cual se propone que la STZ induce la muerte de las células  $\beta$  fue por alquilación del ADN (Szkudelski, 2001).

Laybutt *et al.* (2002), realizaron un estudio del incremento en la expresión de genes antioxidantes y antiapoptóticos que puedan contribuir a la supervivencia de las células  $\beta$  del páncreas, durante la hiperglicemia crónica, reportando que conforme se incrementan los niveles de hiperglicemia crónica, se aumenta progresivamente la expresión de algunas enzimas como el hemo oxigenasa-1, glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa y genes antiapoptóticos como son el gen A20 y BCL-2.

Hainan *et al.* (2005) trabajando con ratones transgénicos que sobre expresan CAT o Mn-SOD, demostraron que al sobre expresarse cada una de las dos enzimas por separado, retarda significativamente el desarrollo de la diabetes inducida por STZ y al sobre expresarse las dos enzimas juntas, la protección se incrementa al doble.

Tiedge (1998) encontró que la sobre expresión de catalasa y glutatión peroxidasa en combinación, protegen a las células del estrés oxidativo en una línea celular productora de insulina sometida a diferentes ROS.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de la testosterona sobre la expresión de las enzimas antioxidantes, CAT y Mn-SOD en islotes pancreáticos de rata macho con daño temprano por STZ.

## **HIPÓTESIS**

La testosterona podría regular la expresión de enzimas CAT y Mn-SOD en islotes pancreáticos de rata con daño temprano por STZ.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Para la realización del presente trabajo, se decidió abordar el objetivo planteado utilizando dos modelos de trabajo, el modelo *in vivo* y el modelo *in vitro*.

### **Modelo *in vivo***

Se trabajó con el modelo de ratas con apoptosis de las células  $\beta$  pancreáticas producida por STZ, previamente reportado por Morimoto (2005). Se utilizaron 5 ratas macho de la cepa Wistar de 250-300 g de peso, los cuales se inyectaron con 60 mg de STZ por kg de peso corporal y se sacrificaron después de 6 horas de tratamiento.

Dado que no se obtuvieron islotes después de 6 horas de la administración de la STZ, se inyectaron otras 5 ratas con la misma dosis de STZ y se sacrificaron 1, 2, 3, 4 y 5 horas después del tratamiento, posteriormente se obtuvieron los islotes por el método de digestión con colagenasa después de cada tiempo de tratamiento.

## **Aislamiento y Cultivo de islotes Pancreáticos**

Se realizó la obtención de islotes de Langerhans por el método de digestión con colagenasa, según modificación del método de Lacy y Kostianovsky (1967). El páncreas de la rata fue perfundido (a través del ducto pancreático) con 10 ml de solución de aislamiento de islotes (SAI, ver apéndices 1 y 2), para extraerlo por completo. El páncreas se cortó en fragmentos de aproximadamente 1 mm con unas tijeras y se sometió a digestión con 3 mg de colagenasa P (Boehringer Mannheim) por páncreas a 37 °C, en un baño maría por 9 min con una agitación de 170 golpes/minuto. Después de la digestión, el tejido pancreático se lavó 2 veces con solución SAI, se centrifugó y purificó utilizando un gradiente de ficol 400DL (SIGMA) con concentraciones de 27, 23, 20 y 11% y se centrifugó a 2000 rpm por 15 minutos.

Los islotes fueron extraídos de la primera interfase y se lavaron una vez en solución SAI, se centrifugaron para eliminar la solución SAI. Después se resuspendieron y se sembraron en un número de 200 islotes, en cajas de petri, en solución SAI.

Los cultivos se mantuvieron en un incubador a 37°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>, por 12 horas.

## **Modelo *in vitro***

Para el modelo *in vitro* se extrajeron islotes pancreáticos de 5 ratas macho y se realizó un cultivo para establecer la viabilidad de los islotes mediante la producción de insulina con baja glucosa (5 mM) y en condiciones de estimulación máxima con KCl (50 mM), en un incubador a 37°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. Después de una hora se tomó 1 ml del medio de cultivo para la cuantificación de insulina por el método de RIA.

### **Cuantificación de insulina**

De los medios obtenidos de los islotes bajo los diferentes tratamientos se cuantificó la concentración de insulina mediante la técnica de radioinmunoanálisis (RIA). Estuche desarrollado y avalado por el Dr. Eulises Díaz Díaz y colaboradores en el departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. (Ver apéndice 3).

### **Tiempo y concentración de STZ**

Con la finalidad de determinar la concentración de STZ y el tiempo de exposición de los islotes a este diabetógeno, se realizaron cultivos de 10 islotes cada uno y se trataron con 0.05, 0.1, y 0.5 mM de STZ por 5, 10 y 15 minutos de exposición, en un incubador a 37°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>, posteriormente se tomó 1 ml del medio y se analizó por RIA para la cuantificación de insulina.

Por otra parte se realizó un cultivo de islotes con las diferentes concentraciones de STZ por 15 min y se les realizó a los islotes un análisis de Apoptosis mediante el método de TUNEL utilizando el kit DeadEnd<sup>TM</sup>Fluorometric TUNEL System (Promega). (Ver apéndice 4).

### **Aislamiento y Tratamientos de islotes**

Se utilizaron 15 ratas Wistar machos de 200-250g de peso, para la obtención de islotes de Langerhans por el método de digestión con colagenasa, según modificación del método de Lacy y Kostianovsky (1967).



Una vez obtenidos los islotes se colocaron en una caja de cultivo multipozos, 4 grupos de 200 islotes por pozo y se cultivaron a 37°C en un incubador en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> para su recuperación por 12 horas. Después de este tiempo se cambió el medio, y se adicionó a cada pozo el tratamiento correspondiente: al control, etanol 0.01%; a T+STZ, testosterona a 0.01, 0.1 y 1 mg/ml; a T, testosterona a 0.01, 0.1 y 1 mg/ml; a STZ, nada. Se cultivaron por una hora y después se retiró el medio de cada pozo, se congeló a -20°C para la posterior cuantificación de insulina. Los islotes se lavaron con SAI y posteriormente se les adicionó solución nueva más STZ a 0.05 mM por 15 min a los tratamientos correspondientes, transcurrido este tiempo, se retiró el medio y se guardó a -20 °C. A los islotes se les adicionaron 800 µl de TRizol y se guardaron a -70 °C para la posterior extracción de RNA total.

### **Extracción de RNA de islotes**

La extracción de RNA de islotes se realizó utilizando la solución de TRizol (Invitrogen). Los islotes se descongelaron y se agitaron en Vortex por 15 a 30 seg, se congelaron nuevamente a -70°C en un tiempo aproximado de 15 a 20 min, posteriormente se descongelaron a temperatura ambiente y se agitaron en vortex por 30 seg, se continuó el procedimiento de acuerdo con las especificaciones del fabricante (ver apéndice 5).

## RT-PCR

Una vez obtenido el RNA de los islotes de los diferentes grupos, se cuantificó por espectrofotometría y se utilizó la reacción de RT-PCR (retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa) para el estudio de la expresión de las enzimas antioxidantes, utilizando oligonucleótidos específicos para cada una de ellas (Laybutt et al. 2002). En la Tabla 1 se muestra la secuencia de cada oligonucleótido y el tamaño del fragmento amplificado de cada gen.

Tabla 1. Oligonucleótidos de los genes amplificados.

Gen	5' Oligonucleotido 3' Sentido	5' Oligonucleotido 3' Antisentido	bp
Catalasa	GCT CCC AAC TAC TAC CCC AAC	CGT TTC CTC TCC TCC TCA TTC	173
Mn-SOD	CAC CAC AGC AAG CAC CAC	TCC CAC ACA TCA ATC CCC	410
$\beta$ -actina	GGGTCAGAAGGATTCCTATG	GGTCTCAAACATGATCTGGG	230

Las condiciones para realizar el PCR de catalasa y Mg-superóxido dismutasa fueron las siguientes: 94°C durante 10 minutos de desnaturalización, 94°C por 1 minuto, 62°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, 72°C por 5 minutos, por 27 ciclos.

Las condiciones para amplificar  $\beta$ -actina fueron: 94° durante 10 minutos de desnaturalización Y 25 ciclos de 94°C por 30 seg, 55°C por 30 seg, 72°C por 30 seg, 72°C por 5 min.

### **Análisis de los productos de PCR**

Se tomaron 40 µl de los productos de PCR de cada muestra y se analizaron por relectroforesis en gel de agarosa al 2% en amortiguador TBE (Tris Base 0.5 M, ácido bórico 0.5 M, EDTA 10 nM) y finalmente se analizó la expresión de las enzimas antioxidantes (CAT y Mn-SOD), utilizando un método densitométrico. Los resultados se muestran como expresión relativa con respecto al gen constitutivo ( $\beta$ -actina).

### **Análisis estadístico**

Los resultados se analizaron utilizando el programa estadístico sigma stat. Se empleó la prueba de t de student y t- para muestras pareadas. Significancia  $p < 0.5$

## RESULTADOS

### Modelo *in vivo*

Se realizó la obtención de islotes de ratas tratadas con 60 mg de STZ por kg de peso corporal a diferentes tiempos de exposición, como se muestra en la tabla 2. La obtención de islotes fue de 264 después de 1 hora de la inyección de STZ, sin embargo en las horas subsecuentes la cantidad de islotes obtenidos disminuye drásticamente hasta que no es posible obtenerlos.

N°de rata	Tiempo con STZ /hrs.	# de islotes Obtenidos
1	1	264
2	2	58
3	3	0
4	6	0

Tabla 2. Muestra el tiempo de exposición de STZ contra el número de islotes obtenidos. Obtención promedio de islotes a partir de ratas no tratadas 220-280 islotes.

## Modelo *in vitro*

### *Viabilidad de islotes*

Para verificar la viabilidad de los islotes, se cuantificó la secreción de insulina en medio de cultivo de islotes con baja glucosa y con una estimulación de KCl (estimulador químico de la secreción de insulina) por una hora y cuantificado por el método de RIA, obteniendo un valor de insulina para baja glucosa de  $2.82 \pm 0.37$  ng/ml y un valor de  $4.30 \pm 0.35$  ng/ml para la estimulación con KCl. Estos resultados se analizaron mediante una prueba de t de student obteniendo una diferencia estadísticamente significativa en la producción de insulina con una p de 0.007 entre los tratamientos. Este resultado nos indicó que los islotes que se obtuvieron por el método propuesto se encontraban en condiciones adecuadas para la secreción de insulina.

### *Tiempo y concentración de STZ*

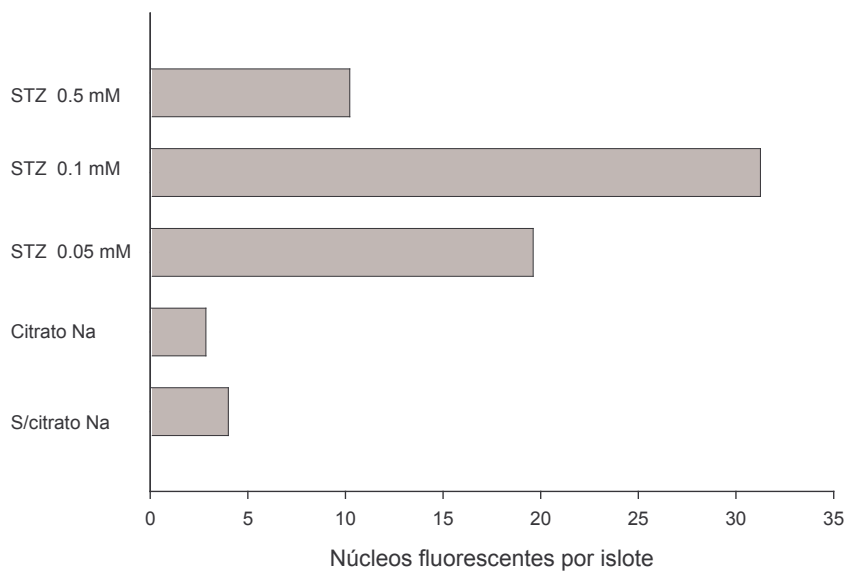
Como se muestra en la tabla 3 la concentración de insulina en el medio de cultivo, no mostró diferencia significativa en los tiempos de 5 y 10 minutos a ninguna de las concentraciones administradas, en comparación con su control. En el tiempo de 15 min se observó una diferencia estadísticamente significativa comparado con su control, con una p de  $< 0.05$  para STZ a 0.05 mM y 0.1mM comparado con su control.

	<u>STZ</u>			
Tiempo	Control	0.05 mM	0.01 mM	0.5 mM
5 min.	<b>1.04 ± 0.69</b>	<b>1.49 ± 0.68</b>	<b>1.30 ± 0.74</b>	<b>1.13 ± 0.72</b>
10 min.	<b>1.12 ± 0.83</b>	<b>1.47 ± 0.59</b>	<b>1.24 ± 0.65</b>	<b>1.28 ± 0.66</b>
15 min.	<b>0.73 ± 0.37</b>	<b>1.51 ± 0.60 *</b>	<b>1.45 0.54 *</b>	<b>1.21 ± 0.78</b>

Tabla 3. Concentración de insulina (ng/ml) en islotes pancreáticos tratados con STZ a diferentes tiempos y concentraciones (n= 8). \* p < 0.05 comparados con el control

## Análisis de Apoptosis en islotes tratados con STZ

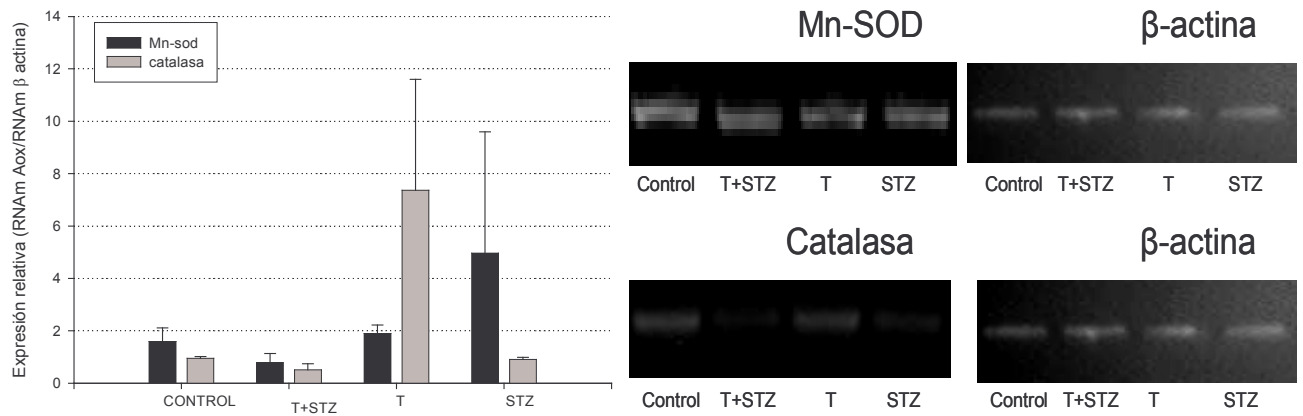
Para estudiar la proporción de islotes que sufrían apoptosis por efecto de la STZ, se realizaron cultivos y después del tratamiento con STZ por 15 min, se analizaron por la técnica de TUNEL. Se encontró que el mayor número de núcleos en apoptosis fue a la concentración de 0.1 mM de STZ y el menor número en la concentración de 0.5 mM de STZ.



Grafica 1. Núcleos fluorescentes por islote (n=10) mediante la técnica de TUNEL

## Expresión de enzimas antioxidantes catalasa y Mn-superóxido dismutasa

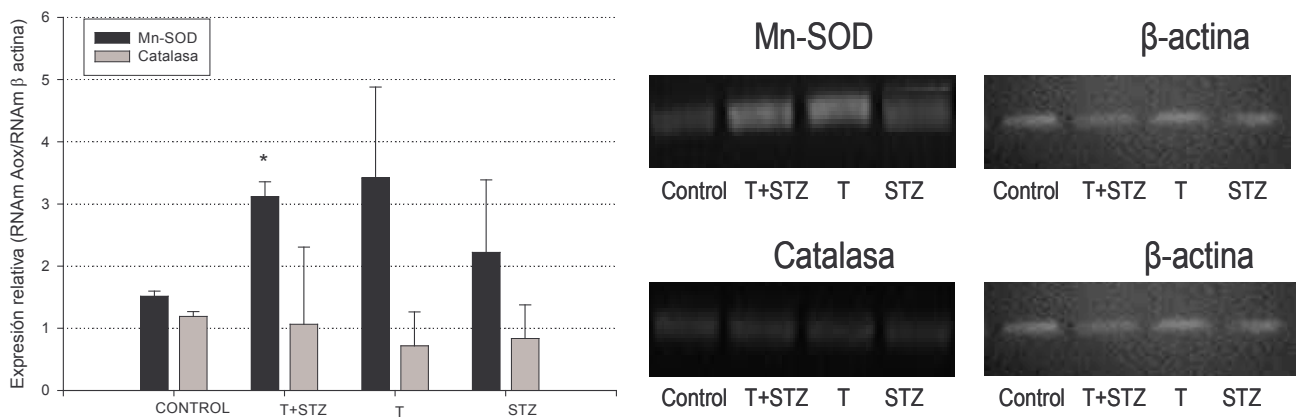
La expresión de las enzimas catalasa y Mn-SOD en los islotes pancreáticos aislados no mostró diferencias significativas entre los tratamientos cuando se incubaron con testosterona a una concentración de 0.01 mg/ml. (Grafica 2)



Grafica 2. Expresión de las enzimas antioxidantes en islotes pancreáticos de rata tratadas con testosterona 0.01 (T) mg/ml y estreptozotocina 0.5 mM (STZ) por 15 minutos, control con etanol y citrato (C). Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  el error estándar de la DO del gen Mn-SOD o catalasa entre gen constitutivo  $\beta$ -actina. Del lado derecho se muestra una fotografía representativa de los amplicones de cada gen.

La expresión de la enzima Mn-SOD muestra una diferencia significativa con STZ más testosterona a una concentración 0.01 mg/ml, al expresarse aproximadamente el doble del valor observado en el control. Por otro lado la testosterona tiene la tendencia por si sola a incrementar la expresión de la enzima Mn-SOD un poco mas que la STZ sola aún cuando ninguna de las dos muestran diferencias estadísticamente significativas con respecto al control.

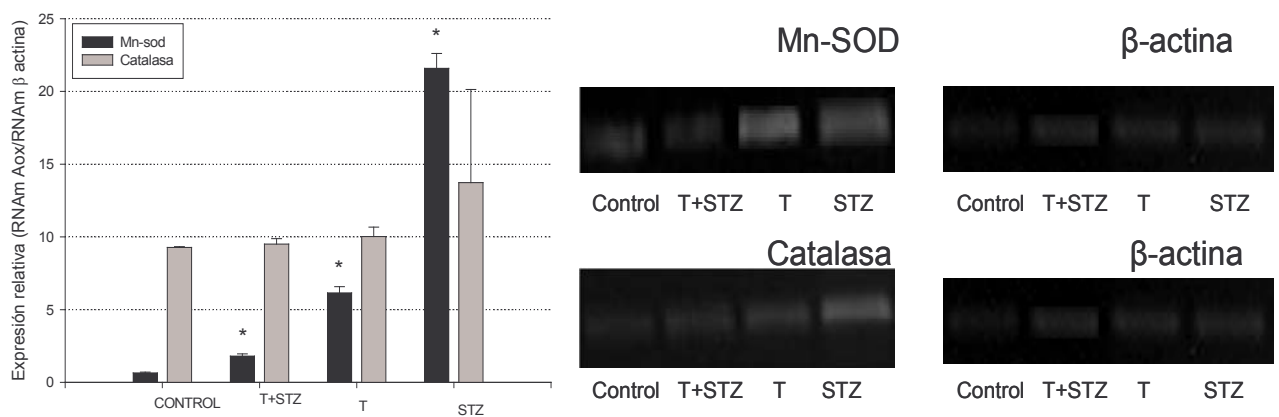
La expresión de la enzima catalasa a la concentración de 0.1 mg/ml, no muestra diferencia entre los tratamientos con respecto al control (Gráfica 3).



Gráfica 3. Expresión de las enzimas antioxidantes en islotes pancreáticos de rata tratadas con testosterona 0.1 mg/ml (T), estreptozotocina (STZ) por 15 minutos, control con etanol y citrato (C). Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  el error estándar de la DO del gen Mn-SOD o catalasa entre gen constitutivo  $\beta$ -actina. \* $p < 0.05$  comparado con (C). Del lado derecho se muestra una fotografía representativa de los amplicones de cada gen.



Por último la expresión de la enzima Mn-SOD presenta una diferencia significativa entre los diferentes tratamientos. Al ser tratados con testosterona 1mg/ml, se observó un incremento de aproximadamente 5 veces mas que el control. Por otro lado al ser tratados con estreptozotocina su expresión se incrementó aproximadamente 20 veces, sin embargo en los islotes tratados con T+STZ solamente se incremento su expresión 1.5 veces con una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) (Gráfica 4).



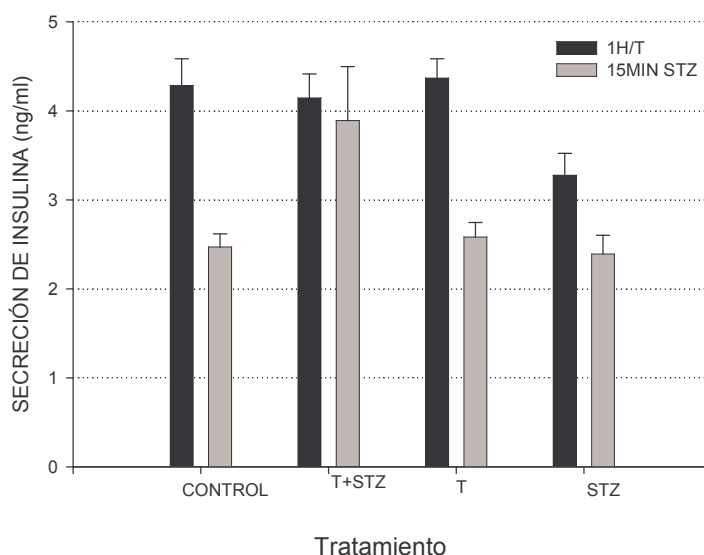
Gráfica 4. Expresión de las enzimas antioxidantes en islotes pancreáticos de rata tratadas con testosterona 1 mg/ml (T), estreptozotocina (STZ) por 15 minutos, control con etanol y citrato (C). Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  el error estándar de la DO del gen Mn-SOD o Catalasa entre gen constitutivo  $\beta$ -actina.

\*  $p < 0.05$  comparado con (C). Del lado derecho se muestra una fotografía representativa de los amplicones de cada gen.

## Secreción de Insulina

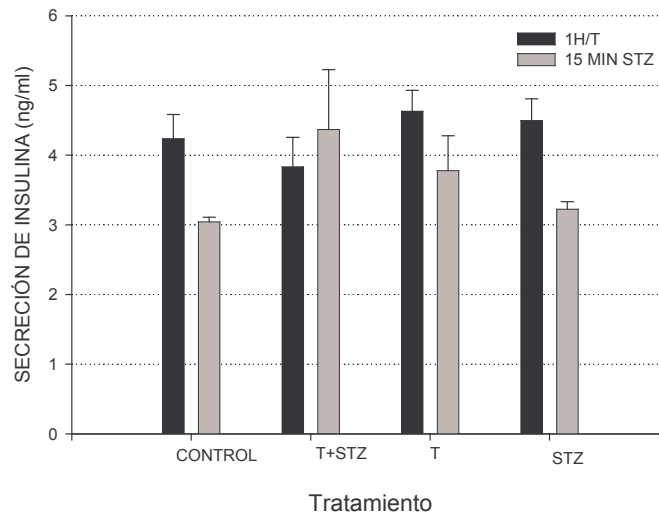
La cantidad de insulina liberada al medio durante una hora no muestra diferencia significativa entre los diferentes tratamientos. En cuanto a la concentración de esta hormona durante 15 min, no se observó diferencia significativa entre los distintos tratamientos, aún cuando T+STZ muestra una tendencia a incrementar la secreción de insulina (Gráficas 5, 6, 7).

La insulina liberada al medio después de una hora de tratamiento con 0.01mg/ml testosterona no es significativa entre los tratamientos, sin embargo a los 15 min con T+STZ se incrementa un 30%, aun cuando no es una diferencia significativa, con este tratamiento se muestra un cambio en la secreción de insulina al medio (Gráfica 5).



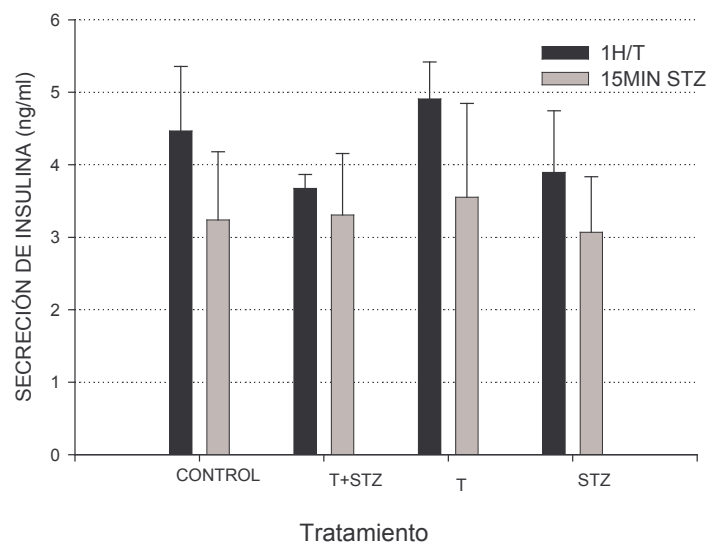
Gráfica 5. Concentración de insulina secretada al medio por islotes pancreáticos de rata. Los cultivos de islotes fueron tratados por una hora con testosterona 0.01 mg/ml (T) y posteriormente con estreptozotocina 0.5 mM (STZ) o con etanol y citrato al control (C) por 15 minutos.

La cantidad de insulina liberada al medio, después de una hora de tratamiento con testosterona 0.1 mg/ml no es significativa entre los tratamientos, sin embargo a los 15 min con T+STZ se incrementa un 33% y solamente con testosterona un 20%. Aun cuando no es una diferencia significativa estos tratamientos muestran un incremento discreto en la secreción de insulina al medio (Gráfica 6).



Grafica 6. Concentración de insulina secretada al medio por islotes pancreáticos de rata. Los cultivos de islotes fueron tratados por una hora con testosterona 0.1 mg/ml (T) y posteriormente con estreptozotocina (STZ) 0.5 mM por 15 minutos con etanol y citrato al control (C).

La concentración de insulina secretada al medio por islotes durante una hora con 1mg/ml testosterona muestra un ligero incremento, sin embargo en el tratamiento con T+STZ así como el de STZ no se incrementó la concentración. En cuanto a la secreción de insulina por 15 minutos ninguno de los tratamientos muestra una diferencia significativa (Gráfica 7).



Grafica 7. Concentración de insulina secretada al medio por islotes pancreáticos de rata. Los cultivos de islotes fueron tratados por una hora con testosterona 1 mg/ml (T), por 15 minutos de estreptozotocina (STZ) 0.5 mM y con etanol y citrato al Control (C).

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo se muestran los efectos de la testosterona sobre la expresión de enzimas antioxidantes catalasa y Mn-SOD en islotes pancreáticos de rata.

En el modelo *in vivo*, se trató a un grupo de ratas para trabajar con el modelo de apoptosis temprana por STZ (Morimoto, 2005) a diferentes tiempos de exposición a STZ, como se muestra en la tabla 1. Sin embargo a partir de las dos horas de la inyección se redujo drásticamente la cantidad de islotes que se obtenían, a las 3 y 6 horas de tratamiento ya no fue posible obtener islotes. Pensamos que esto se debe a que estos quedaban susceptibles a la colagenaza y eran digeridos juntamente con el tejido que los rodea. Por esta causa se optó por trabajar en el modelo *in vitro*, ya que era insuficiente la cantidad de islotes que se aislaban a las 2 horas en comparación con ratas no tratadas en donde el número promedio de islotes que se obtiene es de 220-280 islotes.

En el modelo *in vitro*, se determinó el tiempo y concentración de la STZ que se utilizaría en el experimento mediante cultivos de islotes pancreáticos, tratados con diferentes concentraciones de STZ y tiempos de exposición, se observó una diferencia significativa a los 15 minutos con las concentraciones de 0.05 y 0.1 de STZ, en la secreción de insulina. Sin embargo se pretendía un daño ligero en los islotes con la STZ por lo que se eligió la concentración de 0.5 mM de STZ por 15 min ya que esta no modifica la secreción de insulina con respecto al control, lo que nos dice que a pesar de que hay células en apoptosis, la funcionalidad del islote no se ha alterado, algo que había sido establecido previamente en el modelo propuesto por Morimoto et al. 2005. A este respecto Haina (2001) y Nobuyuki *et al*, (1990) reportan que la STZ a 1 mM en islotes pancreáticos aislados comienza a fragmentar el DNA a partir de los 7 minutos y el efecto completo se observa a los 20 minutos, asimismo al ser fragmentado el DNA

se inhibe la síntesis de proinsulina y por lo tanto la secreción de insulina se ve disminuida.

Como se muestra en las Graficas 2, 3 y 4 la testosterona tiene un efecto en la expresión de la enzima Mn-SOD, ya que en las tres concentraciones se observa un incremento en los niveles de RNA mensajero de la enzima, siendo la concentración de 1 mg/ml de testosterona la que produjo un incremento estadísticamente significativo.

En tejidos como la próstata de rata se ha reportado que la enzima Mn-SOD es regulada directamente por andrógenos, en específico por testosterona ya que reduce el estado oxidativo *in vivo* en la rata cuando es sometida a un elevado estrés oxidativo inducido por una pancreatectomía, en ratas previamente castradas y ratas castradas suplementadas con testosterona (Tam, 2003).

La enzima Mn-SOD también tiende a incrementar su expresión en los islotes tratados solamente con STZ, esto se debe a que esta enzima probablemente es inducida por la exposición al estrés oxidativo que produce la administración de la STZ.

Laybutt (2002) y Hainan (2005), trabajando con cultivos de islotes pancreáticos sometidos a estrés oxidativo, reportan que la expresión de la enzima Mn-SOD se sobre-expresa hasta 1.4 veces más que su control, mientras que la expresión de la enzima catalasa no se modifica. Estos datos concuerdan con lo obtenido en el presente estudio, tal como se muestra en las figuras 4, 5 y 6 en donde se observa que la expresión de la enzima catalasa no se modifica por efecto del tratamiento con STZ.

Analizando los resultados de la expresión de la catalasa en los islotes tratados con testosterona, se observa que esta enzima no muestra una diferencia significativa por efecto de las diferentes concentraciones de testosterona utilizadas.

Tam (2003) reporta en tejido de próstata que la enzima catalasa se muestra insensible a la privación de andrógenos producida por la castración en ratas macho, pero cuando estas ratas son suplementadas con testosterona, la enzima se sobreexpresa. En cuanto a los resultados obtenidos en el presente estudio, este efecto solamente se observó con la concentración de 0.01 mg/ml de testosterona, sin embargo este efecto se ve reducido cuando se aplica la STZ. Este mismo efecto se presenta en las tres concentraciones de testosterona (Gráficas 4, 5 y 6) con la enzima Mn-SOD siendo estadísticamente significativa a concentraciones de 0.1 y 1 mg/ml de testosterona; esto podría deberse a las reacciones de oxidación-reducción de la enzima ante el estrés oxidativo producido por la STZ, ya que al entrar a la célula de la misma forma que la ruta de glucosa (a través del GLUT2) es metabolizada por las células y se produce  $H_2O_2$  y éste a su vez genera radicales libres como  $\cdot OH$  (el radical hidroxilo) generando así la cascada de especies reactivas de oxígeno y produciendo un estrés oxidativo en la célula; ante este estrés, las células pueden responder a las ROS con antioxidantes como protección o pueden usarlos como segundos mensajeros. (Szkudelski, 2001)

La testosterona administrada como tratamiento por 1 hora, no mostró una diferencia significativa en la secreción de insulina al medio por los islotes pancreáticos debido a que este tiempo no fue suficiente para provocar efectos en la secreción, ya que se ha reportado que en una hora de tratamiento con testosterona, se registra un incremento en la expresión del gen de insulina y después de 3 horas de tratamiento con testosterona se observa un aumento en la insulina almacenada y en la concentración de insulina secretada (Morimoto, 1999).

En los islotes pancreáticos tratados con STZ preincubados con testosterona, se observó un incremento en la secreción de insulina a dosis de testosterona de 0.01 y 0.1 mg/ml, esto puede deberse al efecto de la testosterona ante el estrés producido

por la STZ, ya que en los tratamientos de T y STZ por separado no presenta un incremento marcado como con ambos tratamientos.

Con los datos obtenidos en el presente trabajo podemos decir que la testosterona tiene un efecto sobre la expresión de la enzima Mn-SOD y que este depende de la concentración de testosterona, asimismo que la sobre expresión de esta enzima puede proteger a los islotes pancreáticos del estrés oxidativo, previniendo la apoptosis producida por la administración de STZ.



## CONCLUSIONES

- La STZ induce apoptosis temprana en el islote, a los 15 min de tratamiento a una concentración de 0.5 mM estas condiciones son las que más se asemejan al modelo *in vivo*.
- La testosterona regula la expresión de la enzima Mn-SOD en islotes pancreáticos de rata macho y este efecto es dependiente de la concentración.
- El efecto de la testosterona en la expresión de la enzima Mn-SOD podría proteger a los islotes pancreáticos del estrés oxidativo.
- La testosterona no muestra efecto sobre la expresión de la enzima CAT, aun cuando muestra una tendencia a incrementarse a una concentración de 0.01 mg/ml.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Acevedo RB, Lacava Z G, Miyasaca C K, Chavez S.B, Curt R. 2001.Regulation of antioxidant enzyme activities in male and female rat macrophages by sex steroids. Braz.J.Med.Biol.Res. 31:683-687.

Beato M.1988. Gene regulation by steroid hormones. Cell 56:275-284.

Carson-Jurica MA, Schrader WT, O'Malley W. 1990. Steroid receptor family structure and functions. Endocrine Rev. 11:201-214.

Cascales M. 1999. Estrés oxidativo, Envejecimiento y Enfermedad, Ed. Instituto de España, Madrid, pp266.

Friesen, NT, Buchau A.S, Schott-Ohly P, Lgssiar A, Gleechmann H. 2004. Generation of hydrogen peroxide and failure of antioxidative responses in pancreatic islets of male C57BL/6 mice are associated with diabetes induced by multiple low doses of streptozotocin. Diabetologia 47:676-685.

Gamaley A, Kluybin IV. 1999. Roles of reactive oxygen species: signaling and regulation of cellular functions. Int. Rev. Cytol. 188:203-55.

Gutteridge J, Halliwell B. 1999. Antioxidant protection and oxygen radical signaling: reactive oxygen species in biological systems: an interdisciplinary approach. New York: Plenum Publishers.

Hainan C, Li Epstein. 2005, Mn-SOD and Catalasa Transgenes Demonstrate That Protection of Islets From Oxidative Stress Does Not Alter Cytokine Toxicity. *Diabetes* 54:1437-1446.

Haskins K, Bradley B, Powers K. 2003. Oxidative stress in Type 1 Diabetes, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1005:43-54.

Kaneto, Kajimono Y, Miyagawa J, Matsuoka T, Fujitani Y, Umayahara Y, Hanafusa T, Matsuzawa Y, Yamasaki Y. 1999. Beneficial Effects of Antioxidants in Diabetes, Possible Protection of Pancreatic  $\beta$ -Cells Against Glucose Toxicity. *Diabetes* 48:2398-2406.

Kwon KB, Kim EK., Jeong ES, Lee YR, Park JW, Ryu DG, Park BH. 2006. Cortex cinnamomi extract prevents streptozotocin-and cytokine-induced  $\beta$ -cell damage by inhibiting NF-kB. *World Gastroenterol.* 27: 4331-4337.

Lacy PE and Kostianovsky M, 1967, Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 16:15-23.

Landers JP and Spelberg TC. 1992. New concepts in steroid hormone action: transcription factors, proto-oncogenes, and the cascade model for steroid regulation of gene expression. *Crit.Rev.Eukaryot..Gene Express.* 2:19-63.

Laybutt DR, Kaneto H, Hasenkamp W, Grey S, Jean-Christophe Jonas, Sgroi C, Groff A, Ferran C, Bonner-WS Sharma A, Weir GW, 2002, Increased Expression of antioxidant and Antiapoptotic, genes in islets that may contribute to  $\beta$ -Cells survival during chronic hyperglycemia. *Diabetes* 51:413-423.

Le May C, Chu K, Hu M, Ortega C, Simpson ER, Korach KS, Tsai M, Jarvis MJ, 2006, Estrogens protect pancreatic  $\beta$ -cells from apoptosis and prevent insulin-deficient diabetes mellitus in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: 9332-9337.

Luque CJ, 2001, Biología Molecular e Ingeniería Genética, Ed. Harcourt, España, pp., 445.

Morales MM, Robles DG, Díaz SV, 2007 . Las hormonas esteroides y el páncreas un nuevo paradigma, Rev. Inves. Clín.59:124-129.

Morimoto S, Mendoza RCA, Hiriart M., Larrieta M.E., Vital P.,Cerbón MA, 2005. Protective effect of testosterone on early apoptotic damage induced by streptozotocin in rat pancreas. J. Endocrinol. 187:217-224.

Morimoto S, 1999, Efecto de los esteroides sexuales sobre la síntesis y liberación de insulina en la rata: estudios *in vivo* e *in vitro*. Tesis Para obtener el grado de Doctor en Ciencias. UNAM. C. Neurobiol.pag.62

Pushkala K, Gupta P, 2001. Steroid hormones regulate programmed cell death: a review. Citobios, 106:201-217.

Rosmalen GM, Pigmans J.G.,Kersseboom R.,Drexhage H.A.,Leenen PJ,Homo DF, 2001, Sex Steroids Influence Pancreatic Islet Hypertrophy and Subsequent Autoimmune Infiltration in Nonobese Diabetic (NOD) and NODscid Mice. Diabetes 81: 231-238

Sierra VMP, Guzmán-Grenfell AM, Olivares-Corichi IM, Torres RYD, Hicks GJJ. 2004. Participación de las especies reactivas del oxígeno en las enfermedades pulmonares Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex. 17; 134-148

Srinivasan A, Menon VP. 2003. Protection of pancreatic  $\beta$  cell by the potencial antioxidant bis-o hydroxycinnamoyl methane, analogue of natural curcuminoid in experimental diabetes. J . Pharmaceut. Sci. 6:327-333.

Szkudelski T. 2001. The mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in  $\beta$ -Cells of the rat pancreas, Phis.I Res., 50: 536-546.

Tam N N C, Gao Y, Leung Y, Ho S. 2003. Androgenic Regulation of Oxidative Stress in the Rat Prostate. Am.J.Pathol. 163:2513-2522.

Takasu N, komiya I, Asawa T, Nagasawa Y, Yamada T.1991. Streptozocin- and alloxan-induced  $H_2O_2$  generation and DNA fragmentation in pancreatic islets.  $H_2O_2$  as mediator for DNA fragmentation. Diabetes 40:1141-1145.

Tiedge Markus, Lortz S, Munday R, Lenzen S.1998. Complementary Action of Antioxidant Enzymes in the Protection of Bioengineered Insulin-Producing RINm5F Cells Against the Toxicity of Reactive Oxygen Species. Diabetes 47:1578-1584.

Tresguerres, JA. 1992. Fisiología humana, Ed. McGRAW-HILL, Madrid España, pp. 678

Venereo G. 2002. Daño oxidativo, Radicales libres y Antioxidantes, Rev. Cub. Med. Mil. 21:126-33

Yamamoto KR. 1985. Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Ann. Rev. Genet.* 19:209-252

## APÉNDICE 1

### Solución de Aislamiento de Islotes (SAI)

NaCl	1.15 mM
NaHCO <sub>3</sub>	10 mM
KC	15 mM
MgCl <sub>2</sub>	1.1 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.2 mM
HEPES	25 mM
CaCl <sub>2</sub>	2.5 mM
Glucosa	5 mM
BSA	0.2 %
pH	7.4

## APÉNDICE 2

### Metodología para aislamiento de islotes pancreáticos de rata

- 1.-Inyectar a la rata con la anestesia
- 2.-Colocar la rata boca arriba y se limpia con alcohol
- 3.-Cortar la piel en el centro del vientre
- 4.-Cortar el músculo por el centro y se realiza un corte diagonal de ambos lados hasta las costillas
- 5.-Retraer el músculo hacia atrás y se corta el esternon
- 6.-Con pinzas de hemostasis se bloquea el conducto de wirsung.
- 7.-Realizar un pequeño corte en la ampula de vater y se procede a canular
- 8.-El páncreas se insufla con 10 ml de Sol para islotes
- 9.- Retirar todo el páncreas lentamente cortando con micro tijeras
- 10.-Colocar todos los páncreas en un vaso de precipitado de 50 ml con sol SAI fría.
- 11.-Retirar los pequeños tejidos que no correspondan al páncreas. (grasa, tejido)
- 12.-Cortar el páncreas en otro vaso de precipitado junto con la colagenaza (3 mg de colagenaza x páncreas)
- 13.-Completar a 5 ml X páncreas con SAI
- 14.-Vaciar en el matraz de plástico
- 15.-Colocar en el baño de agitación a 27 °C a velocidad 170 por 5 min
- 16.-Sacar del a baño y se sacude con la mano fuertemente por 5 ó 6 veces
- 17.-Regresar al baño de agitación por 4 min
- 18.- Vaciar a un tubo Falcón de 50 ml y se lleva a 25 ml ó 30 ml según el número de páncreas con la SAI
- 19.- Centrifugar a 1000 rpm 3 min a 4°C
- 20.- Retirar el sobrenadante dejando de 2 a 3 ml con la pastilla
- 21.-Aforar a 25-30 ml con la SAI
- 22.- Centrifugar a 1000 rpm 3 min a 4°C



- 23.-Retirar el sobrenadante dejando de 2 a 3 ml con la pastilla
- 24.-Lo que quedó se homogeniza con la pastilla y se pasa por una coladera
- 25.-Lo que resulta colado se pasa a un tubo falcón de 50 ml y se centrifuga a 1200 rpm, por 5 min
- 26.- Retirar el sobrenadante y se procede a hacer el gradiente.
- 27.-A la pastilla se la agrega 6 ml de Ficoll a 27% y se homogeniza en vortex
- 28.-Agregar 4 ml de ficoll a 23% por las paredes del tubo
- 29.-Agregar 4 ml de ficoll a 20% por las paredes del tubo
- 30.- Agregar 4 ml de ficoll a 11% por las paredes del tubo
- 31.- Se centrifuga a 2000 rpm por 15 min
- 32.-Colectar la interfase de la última capa con una pipeta pequeña y se vacía a un tubo con 6 ml de SAI, posteriormente se afora a 13 ml
- 33.- Centrifugar a 1200 rpm por 5 min
- 34.-Retirar el sobrenadante y se afora nuevamente a 13 ml de SAI
- 35.-Homogenizar con la pastilla y se vacía en una caja petrí negra para recolectar los islotes con una micropipeta de 10  $\mu$ l

## APÉNDICE 3

### Radioinmunoanálisis de insulina.

Es un ensayo desarrollado para cuantificar insulina humana, pero que tiene 98% de reactividad cruzada con la insulina de rata. El método ha sido evaluado contra el RIA de insulina de rata de Linco (Linco Research, Inc. Missouri, USA), obteniéndose resultados consistentemente similares.

Estuche desarrollado y validado por el Dr. Eulises Díaz Díaz y colaboradores en el departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Sensibilidad: 0.03ng/ml

Rango dinámico de la curva estandar: 0-10ng/ml

Coefficiente de variación intraensayo : <5%

Coefficiente de variación interensayo : <10%

Vol. Final 300 µl

CT=Cuentas Totales

UNE=Uniones No Especificas

Bo=Unión Maxima

Valores de la curva estándar=0.16, 0.32, 0.62, 1.25, 2.5, 5, 10.

Muestras control=Concentraciones Bajo, Medio, Alto



Se enumeran los tubos y se llenan por duplicado. Según el siguiente cuadro.

### R e a c t i v o s

Tubos	Buffer	AC	Trazador
CT	-----	-----	100µl
Une	200µl	-----	100µl
Bo	100µl	100µl	100µl
Controles	100µl	100µl	100µl
Muestra	100µl	100µl	100µl
Estandares	100µl	100µl	100µl

-Incubar 18-24 h a 4°C.

-Añadir el segundo anticuerpo e incubar por 30 min

-Centrifugar a 3000 rpm por 30 min a 4 C

-Decantar el sobrenadante. Secar los tubos con un isopo de papel para eliminar el excedente de líquido.

-Contar por 1 minuto en un contador para emisiones gama.

-Calcular los valores de los desconocidos con base en la curva estándar.

## APÉNDICE 4

### Analisis de Apoptosis por el método de TUNEL

Kit DeadEnd™Fluorometric TUNEL System (Promega)

Los islotes fueron fijados en una solución de paraformaldehído al 4% en PBS 0.1 M pH 7.4, a 4 °C por toda la noche. Posteriormente se lavaron los islotes con PBS a temperatura ambiente y se permeabilizaron por 2 horas con 200  $\mu$ l de Triton X-100 al 0.5% a 4°C. Los islotes se enjuagaron con PBS frío al menos 3 veces, se retiró el exceso de líquido y se cubrieron con 100  $\mu$ l de buffer de equilibrio durante 10 min. Luego se colocó el buffer de rTdT. Se pintó con lápiz de cera el área donde fueron puestos los islotes en un portaobjetos recubierto con poli-L-lisina y se les adicionó 50  $\mu$ l de la reacción completa sobre cada conjunto de 10 islotes que se cubrieron con un portaobjetos plástico y se colocaron dentro de una cámara húmeda por una hora a 37°C protegidos de la luz. Transcurrido ese tiempo se lavaron con SSC 2X por 15 min a temperatura ambiente, después se lavaron los islotes con PBS dos veces. Se montaron con vecta shield+DAPI se colocó el cubreobjetos y se aplastaron los islotes. Finalmente se sellaron las preparaciones y fueron observados en un microscopio con filtro para fluorescencia (520  $\pm$  20 nm) y DAPI (460 nm). Se contaron los núcleos fluorescentes por islote.

El control positivo se realizó con una preparación de islotes tratados con DNAsa, el control negativo fue una preparación de islotes con buffer + nucleótidos sin la adición de la enzima, posteriormente se siguieron las indicaciones del fabricante para ambos controles.

## APÉNDICE 5

### Obtención de RNA de islotes pancreáticos

- 1.-Se descongelan los islotes y se agitan en vortex por 30 seg
- 2.-Se congelan nuevamente
- 3.- Se descongelan los islotes y se agitan en vortex por 15 seg
- 4.-Se incuban a temperatura ambiente por 5 min
- 5.- Se agrega cloroformo 200  $\mu$ l por 1 ml de trizol
- 6.-Se agitan en vortex por 15 seg
- 7.-Se incuban a temperatura ambiente por 5 min
- 8.-Se centrifuga por 15 min a 11900 rpm
- 9.- En otro tubo eppendorf con 400  $\mu$ l de isopropanol
- 10.-Se agrega la fase acuosa al tubo con isopropanol
- 11.- Se deja precipitar 30 min ó toda la noche a 4 °C
- 12.- Se centrifuga a 12,000 rpm por 10 minutos a 4 °C
- 13.- Desechar el sobrenadante por decantación.
- 14.-Lavar el botón con 800  $\mu$  de etanol al 75% en H<sub>2</sub>O +DEPC frío.
- 15.-Centrifugar a 10,000 rpm por 5 min a 4 °C.
- 16.-Se desecha el sobrenadante y se deja secar
- 17.-Resuspender la pastilla en 25  $\mu$ l de Agua estéril con DEPC
- 18.-Se congela a -20 °C