



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Red de co-expresión de los canales de potasio dependientes de voltaje Kv2 en célula beta a diferentes estadios del desarrollo”

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
Germán Alonso Bernate Obando

TUTOR PRINCIPAL  
Dra. Myrian Velasco Torres  
[Instituto de Fisiología Celular](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Tamara Luti Rosenbaum Emir

[Instituto de Fisiología Celular](#)

Dra. Lorena Sofía Orozco Orozco

[Instituto Nacional de Medicina Genómica](#)

Ciudad de México. 24 julio, 2019



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.

## **Agradecimientos académicos**

Este trabajo fue apoyado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA)-UNAM apoyos con clave DGAPA-PAPIIT IN210118 e IN210817 y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT- México) apoyo con beca de maestría para Germán Alonso Bernate Obando.

## **Agradecimientos personales**

A mi madre, quien me guio y brindó todo su afecto, empeño y apoyo durante todas las fases de mi formación académica.

A todos mis compañeros del laboratorio, Rosa, Jean, Iskra, Zyanya, Manuel, Yuriko, Carmen, Jazmín, Alberto y Carlos, por su apoyo, consejos y buenos momentos.

A la dra. Myrian Velasco Torres, quien fungió como una excelente asesora, consejera y guía durante el desarrollo del presente proyecto.

A la dra. Marcia Hiriart, pilar en el equipo de trabajo en el que se realizó el presente proyecto y cuyos consejos fueron de gran importancia para mi crecimiento académico e interés en el campo de la fisiología.

A los miembros de mi comité tutorial, Dra. Tamara Luti Rosenbaum y Dra. Lorena Sofía Orozco Orozco por sus sugerencias para mejorar el proyecto.



## Contenido

<b>Resumen</b>	5
<b>Abstract</b>	6
<b>Marco teórico</b>	7
1. Fisiología de la célula $\beta$ pancreática	7
1.1 El páncreas y los islotes pancreáticos	7
1.3 Secreción de insulina estimulada por glucosa	10
1.3.1 Secreción bifásica de insulina	11
1.3.1.1 Exocitosis de insulina	11
1.3.1.2 Acoplamiento	11
1.3.1.3 Preparación	12
1.3.1.4 Fusión	12
1.3.2 Participación de los canales dependientes de voltaje Kv2 en GSIS	13
1.4 Maduración funcional de la célula $\beta$ pancreática	15
1.4.1 Etapa neonatal	16
1.4.2 Destete	19
<b>Antecedentes</b>	22
<b>Planteamiento del problema</b>	29
<b>Hipótesis</b>	30
<b>Objetivos Generales</b>	31
<b>Objetivos específicos</b>	31
<b>Metodología</b>	32
1. Obtención y filtrado de datos	32
2. Construcción y análisis de las redes de coexpresión para Kcnb1 y Kcnb2	33
3. Obtención y análisis de redes regulatorias	36
3.1 Análisis de información mutua	36
3.2 Redes bayesianas	39
3.3 Redes de coexpresión pesadas con algoritmo WGCNA	42
<b>Resultados</b>	44
1. Redes bayesianas	47
2. Análisis de coexpresión diferencial (Adultos y 20 días)	48
3. Redes de coexpresión pesadas (“Weighted”) con algoritmo WGCNA (Kcnb2)	48
4. Redes de coexpresión pesadas (“Weighted”) con algoritmo WGCNA (Kcnb1)	49
<b>Discusión</b>	59
1. Los canales Kv2.1 y su regulación transcripcional	63
2. Los canales Kv2.2 y su regulación transcripcional	65
3. Genes reguladores de la expresión de los canales Kv2 y su participación en la maduración funcional	67
4. La cascada de señalización de TGF $\beta$ y su participación en la regulación transcripcional de los canales Kv2	68
5. Aporte del trabajo y sus limitaciones	69
<b>Conclusiones</b>	70
<b>Referencias</b>	71

## Resumen

El desarrollo postnatal de las células  $\beta$  pancreáticas de rata ocurre durante el primer mes de vida. Alrededor del día 20 de desarrollo postnatal 20 (p20), suceden cambios fisiológicos y estructurales en los islotes pancreáticos y las células  $\beta$  adquieren madurez funcional, secretando insulina en respuesta a cambios en la concentración extracelular de glucosa.

Con el propósito de entender y caracterizar la maduración funcional de las células  $\beta$ , llevamos a cabo en nuestro laboratorio un análisis del transcriptoma de células  $\beta$  de ratas p20 (inmaduras) y adultas (maduras). Los resultados del análisis indican que la expresión del gen *Kcnb2* (Kv2.2), durante el periodo p20 es menor con respecto a las células  $\beta$  pancreáticas del adulto.

Durante el desarrollo, las células  $\beta$  pancreáticas adquieren la capacidad de secretar insulina de forma bifásica, en respuesta a cambios en la concentración extracelular de glucosa. Este proceso depende de la actividad de diferentes canales iónicos, como el canal de potasio dependiente de ATP (KATP), los canales de calcio y sodio dependientes de voltaje, así como los canales de potasio dependientes de voltaje Kv2.1 y Kv2.2, codificados por los genes *Kcnb1* y *Kcnb2*, que repolarizan el potencial de membrana poniendo fin a la secreción de insulina.

Con la finalidad de conocer la regulación transcripcional de los canales Kv2.1 y Kv2.2 durante la maduración funcional, construimos una red de coexpresión génica para cada gen de interés (*Kcnb1* y *Kcnb2*). La red fue posteriormente analizada utilizando un algoritmo de información mutua (Aracne), redes bayesianas y redes de coexpresión pesadas, identificando genes candidatos a regular la expresión de ambos canales.

Los resultados muestran un clúster de 28 genes regulatorios para *Kcnb2*, dentro de los que se encuentran: *Abat*, *Foxo1*, *Il1r*, *Stx3*, y *Rab10*. Con respecto a la regulación del gen *Kcnb1* se identificó un clúster de 30 genes regulatorios, dentro los que se encuentran: *Syn1*, *Stxbp1*, *Suox*, *Abat* y *Arca5*. El análisis de red muestra que un pequeño grupo de genes relacionados con funciones fisiológicas específicas, como el acoplamiento membranal de vesículas secretoras parecen participar en la regulación de la expresión de ambos canales, siendo capaces de identificar una variedad de diferentes clústeres, cada uno relacionado con un proceso fisiológico específico.

## Abstract

The postnatal development of rat pancreatic  $\beta$  cells occurs during the first month of life. Around postnatal day 20 (p20) several physiological and structural changes occur in pancreatic islets and  $\beta$  cells acquire functional maturity, allowing them to release insulin in response to changes in extracellular glucose concentration. To better understand and characterize  $\beta$ -cell functional maturation, a transcriptome analysis from p20 (immature) and adult (mature) rat  $\beta$  cells was carried out in our lab. According to the results, the expression of *kcnb2* gene at p20 was decreased with respect to adult pancreatic  $\beta$  cells. During development, pancreatic  $\beta$  cells acquire functional maturity, allowing them to respond to variations in extracellular glucose concentration secreting insulin.

Glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) depends on the activity of different ionic channels, including the ATP gated potassium channel (KATP), voltage-gated calcium and sodium channels as well as voltage-gated potassium channels (Kv2). *Kcnb1* and *Kcnb2* genes codify for Kv2.1 and Kv2.2 potassium channels which repolarize  $\beta$ -cell action potential and end GSIS.

In order to know the gene regulation of Kv2.1 and Kv2.2 channels during functional maturation, we constructed a gene coexpression network for each gene of interest (*Kcnb1* and *Kcnb2*). The network was analyzed by using "Aracne" algorithm, Bayesian network analysis and weighted gene coexpression networks, candidate regulatory genes were identified.

Regulatory genes identification resulted in a cluster of 28 candidate regulatory genes for *Kcnb2*, amongst which *Abat*, *Foxo1*, *Il1r*, *Stx3*, and *Rab10* were found. Regarding identification of regulatory genes for *Kcnb1* a cluster of 30 genes was found, with *Syn1*, *Stxbp1*, *Suox*, *Abat* and *Arca5* being within the cluster.

The functional enrichment analysis and the regulatory candidate gene identification have shown that a small number of physiologically related e.g. (insulin granule docking genes) seem to participate in the regulation of expression of both channels, being able to identify a variety of different clusters, each related to a unique physiological task.

## **Marco teórico**

### **1. Fisiología de la célula $\beta$ pancreática**

#### **1.1 El páncreas y los islotes pancreáticos**

El páncreas es una glándula compleja, ubicada en la cavidad abdominal, en posición retroperitoneal, entre el bazo y el duodeno, se encuentra dividido en una cabeza (región que delimita con el duodeno), un cuerpo y una cola (región limitante con el bazo). La región de la cabeza se encuentra en el centro del duodeno, mismo que tiene forma de C (Mahadevan, 2016).

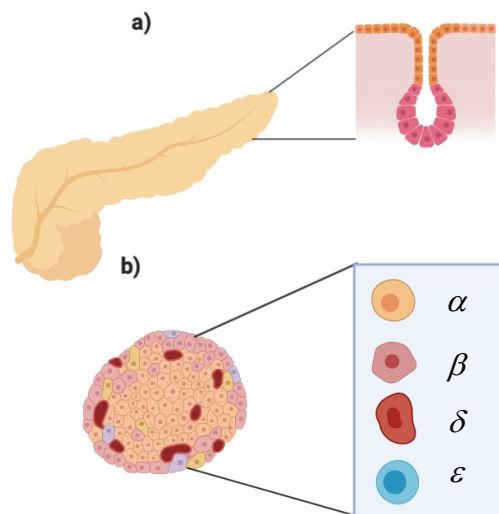
La cabeza y el cuello del páncreas reciben irrigación sanguínea a través de la rama superior e inferior de la arteria pancreatoduodenal. La rama superior de la arteria pancreatoduodenal proviene de la arteria hepática común y forma parte del tronco celiaco. La rama inferior por su parte es continuación de la arteria mesentérica superior. El cuerpo y la cola del páncreas se encuentran irrigados por múltiples ramas de la arteria esplénica. El drenaje venoso del páncreas está dado por la vena porta, a través de las venas pancreatoduodenales superior e inferior que drenan la sangre proveniente de la cabeza y el cuello del páncreas (Mahadevan, 2016).

El páncreas se encuentra ricamente inervado a través de fibras simpáticas y parasimpáticas aferentes y eferentes. Las fibras simpáticas provienen de neuronas que se originan en la cadena paravertebral ganglionar simpática, mientras que las fibras parasimpáticas provienen del nervio vago. La mayor parte de las neuronas parasimpáticas que inervan al páncreas a través del nervio vago tienen su origen en el tallo cerebral, de manera particular en los núcleos del tracto solitario y motor dorsal del vago (Mahadevan, 2016).

Durante el desarrollo embriológico, el páncreas se origina a partir de las evaginaciones endodérmicas ventral y dorsal. La evaginación ventral da origen a la porción inferior de la cabeza del páncreas, mientras que la evaginación dorsal da origen al resto de la glándula (Mahadevan, 2016).

El páncreas es una glándula de secreción mixta, compuesto por tejido con función exocrina y endocrina. El tejido exocrino conforma alrededor del 98% de la masa total del páncreas y se encuentra compuesto por acinos y conductos. El 2% restante de la masa total del páncreas corresponde al páncreas endocrino, cuya unidad funcional son los islotes pancreáticos, los cuales son estructuras de forma ovoide, distribuidas a lo largo de todo el páncreas, con mayor abundancia en la región de la cola (Figura 1). Cada islote a su vez cuenta con 5 tipos diferentes de células secretoras: células  $\alpha$ , productoras de glucagón; células  $\beta$ , productoras de insulina; células  $\delta$ , productoras de somatostatina; células PP, productoras de polipéptido pancreático y células  $\varepsilon$ , productoras de grelina en el páncreas en desarrollo (Hiriart *et al.*, 2014).

Alrededor del 80% del área total de los islotes pancreáticos se encuentra conformada por las células  $\beta$ , mismas que de manera exclusiva, producen y secretan insulina ante cambios en la concentración extracelular de glucosa. La secreción de insulina se encuentra bajo estrecho control a través de señales parácrinas, autocrinas y neurohormonales (Hiriart *et al.*, 2014).



**Figura 1.** Componentes exocrino y endocrino del páncreas. a) estructura general del páncreas con detalle de un acino pancreático, mismo que conforma el 98% de la estructura total del páncreas y es la unidad funcional del páncreas exocrino. b) islote pancreático junto con las células que lo componen.

## 1.2 La insulina y sus acciones

La insulina es una hormona anabólica que juega un papel fundamental en la homeóstasis de la glucosa y almacenamiento de carbohidratos, lípidos y proteínas en el tejido adiposo, músculo e hígado (Hiriart *et al.*, 2014). En el hígado la insulina favorece la síntesis y almacenamiento de glucógeno, además de inhibir la glucogenólisis y la gluconeogénesis, limitando la liberación de glucosa al torrente sanguíneo. Por su parte el tejido adiposo responde a la insulina permitiendo el ingreso y almacenamiento de ácidos grasos, además de favorecer su síntesis. Finalmente, en el musculo la insulina permite el paso de la glucosa a través del trasportador inulina-dependiente GLUT4, además de favorecer la síntesis y almacenamiento de glucógeno.

Las acciones de la insulina se llevan a cabo después de que la insulina se une a su receptor. El receptor de insulina (RI) es una proteína con actividad de tirosina cinasa, capaz de llevar a cabo autofosforilación de residuos de tirosina, iniciando de esta manera una cascada de señalización caracterizada por una cadena de fosforilaciones a nivel intracelular en nodos críticos de la cascada (Taniguchi *et al.*, 2006). El RI se expresa en todos los tejidos, teniendo mayor expresión en el músculo, el tejido adiposo, el cerebro y el hígado, mismos que constituyen los órganos blanco de la insulina (Biddinger y Kahn, 2006).

### 1.3 Secreción de insulina estimulada por glucosa

La secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS, por sus siglas en inglés), es un proceso complejo de transducción de señales en la célula  $\beta$  pancreáticas, mismo que se encuentra conformado por eventos proximales, que incluyen la internalización de glucosa y su posterior metabolismo, así como por eventos distales, en los que se activan diferentes canales iónicos (Figura 2) (Hiriart *et al.*, 2014). La glucosa es transportada hacia el citoplasma de las células  $\beta$  pancreáticas, a través de proteínas transportadoras denominadas GLUT's. Existen varias isoformas de GLUT, siendo GLUT1 y GLUT3 los principales transportadores en las células  $\beta$  humanas, mientras que GLUT2 funge como el principal transportador en las células  $\beta$  de roedor (Keane y Newsholme, 2014).

Después de una comida rica en carbohidratos, la concentración extracelular de glucosa aumenta hasta valores de aproximadamente 7 mM, lo que conlleva el transporte de las moléculas de glucosa a través del glucotransportador GLUT2. Tras el ingreso de la glucosa al citoplasma de la célula  $\beta$ , ésta es metabolizada a través de la glucólisis, el ciclo de Krebs y la cadena de transporte de electrones, con el consiguiente cambio en la relación ATP/ADP (Ro der *et al.*, 2016).

El cambio en la relación ATP/ADP provoca el cierre de los canales de potasio sensibles a ATP (KATP), lo que conlleva, junto con la actividad de los canales catiónicos no selectivos (TRPM2) (Uchida y Tominaga, 2011), a una despolarización inicial de la célula  $\beta$ . Posteriormente la actividad de los canales de calcio tipo T como los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje contribuyen a aumentar la magnitud de la despolarización inicial, hasta alcanzar el potencial al cual se activan los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L, la entrada de calcio al interior de la célula desencadena la exocitosis de gránulos que contienen insulina. Después de la secreción de insulina, se alcanza el potencial al cual se activan los canales de potasio dependientes de voltaje Kv2, la salida de potasio disminuye la actividad eléctrica de la célula  $\beta$ , cesando de esta manera la secreción de insulina (Hiriart *et al.*, 2014).

### **1.3.1 Secreción bifásica de insulina**

La secreción de insulina característica de las células  $\beta$  pancreáticas maduras se lleva a cabo de forma bifásica, con una fase inicial rápida (5-10 min de duración), seguida de una segunda fase lenta. Una célula  $\beta$  típica de roedor contiene aproximadamente 6,000 a 10,000 gránulos secretores de insulina, de los cuales menos del 1% pueden ser secretados después de un aumento en la concentración extracelular de glucosa (Gandasi *et al.*, 2018). Lo anterior se debe a la presencia de 2 reservorios o “pools” de gránulos secretores; aquellos que se encuentran fijos y anclados a la membrana, y aquellos que se encuentran en el citoplasma (Gandasi *et al.*, 2018).

### **1.3.2 Exocitosis de insulina**

Los gránulos secretores de insulina pasan por un proceso de exocitosis regulada, el cual en función de estudios bioquímicos y electrofisiológicos se compone de las siguientes etapas: I acoplamiento, II preparación y III fusión (Gerber y Südhof, 2002).

#### **1.3.2.1 Acoplamiento**

Se han identificado 4 familias de proteínas asociadas con el acoplamiento de vesículas secretoras con la membrana plasmática que incluyen a las proteínas; SNARE, NSF, RABS y las proteínas SM (sec1/munc18). Las proteínas SNARE constan de una familia de proteínas con forma de bastón, algunas de las cuales se encuentran en la vesícula (v-SNARE) mientras que otras se encuentran en la membrana con la que se llevará a cabo la fusión (t-SNARE). Las proteínas SNARE están caracterizadas por una secuencia de alrededor de 60 residuos (motivo SNARE) que posee la propiedad de formar espirales (“coils”), formando complejos de unión altamente estables (Gerber y Südhof, 2002). Se ha demostrado que 2 clases de proteínas SNARE asociadas con la membrana plasmática (SNAP-25 y sintaxinas) interactúan con una clase de SNARE vesicular (Sinaptobrevinas o VAMP), facilitando de esta manera el acoplamiento vesicular (Gerber y Südhof, 2002).



### **1.3.2.2 Preparación**

Otro factor limitante para la secreción de insulina lo constituye la preparación o “Priming” de los gránulos. La primera fase de la secreción de insulina se lleva a cabo gracias a la presencia de gránulos que se encuentran preparados (“primed”) y acoplados con la membrana plasmática en el sitio de secreción, y es afectada por moléculas diversas tales como GLP1 y somatostatina a través de cambios en la tasa de preparación (“Priming rate”) de los gránulos (Gandasi et al., 2018).

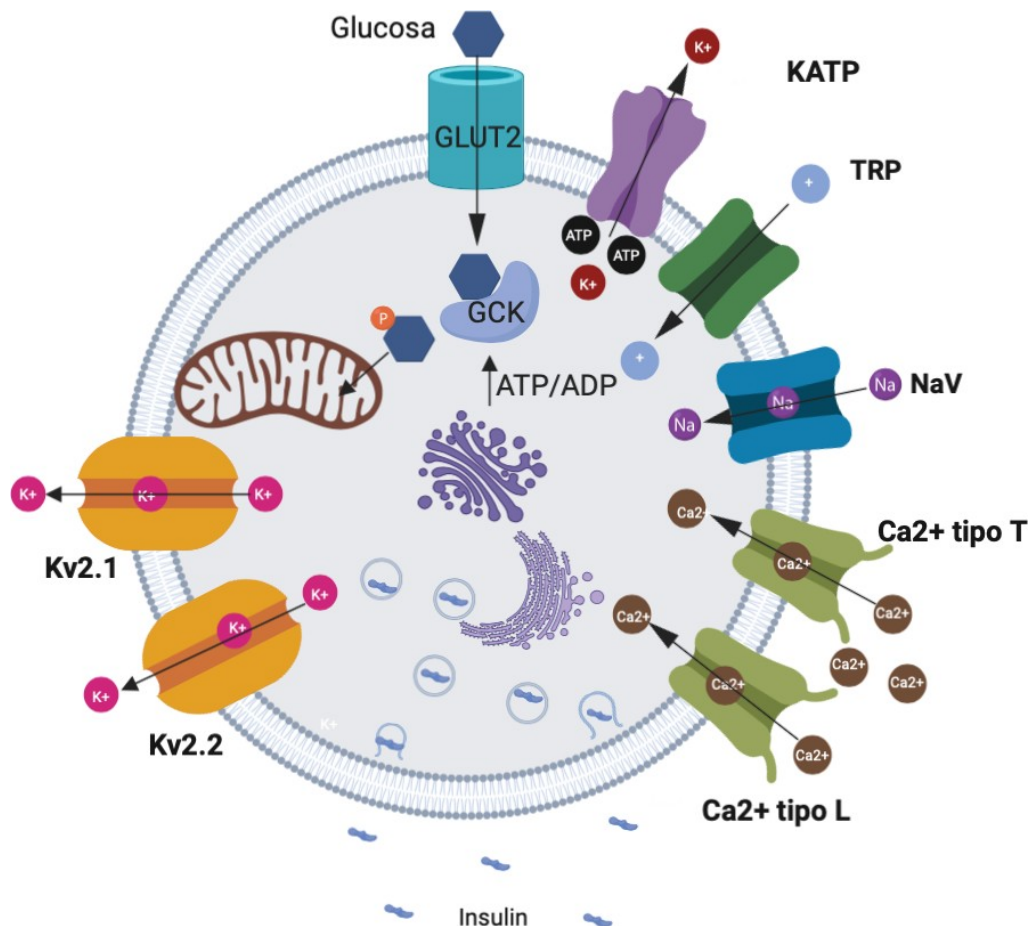
### **1.3.2.3 Fusión**

Las vesículas de insulina, después de ser ensambladas en el aparato de Golgi, son transportadas hacia la superficie para su fusión y liberación. En respuesta a señales metabólicas, de manera particular a un incremento en la concentración de  $Ca^{2+}$ , los gránulos se fusionan con la membrana plasmática y liberan su contenido (J. y M., 2010). Dentro de las moléculas responsables del tráfico vesicular se encuentran las proteínas Rab, mismas que pasan de un estado inactivo asociado con GDP a un estado activo asociado con GTP. Dentro de los Rabs expresados en línea celular INS1, se han identificado el Rab1a, Rab2a y Rab3a. El acoplamiento de Rab3 con su efector rabphilina 3A estimula la secreción de insulina (Suckale y Solimena, 2010). De manera análoga a las proteínas Rab, se ha identificado a una GTPasa denominada Rap1, misma que potencia la secreción de insulina en respuesta a niveles elevados de cAMP. De manera adicional a las Rabs, otras proteínas transmembranales anclan los gránulos de insulina al citoesqueleto o a sus proteínas motoras, por ejemplo, PTPRN se ancla a la red de actina a través de la sintrofina, mientras que el extremo citoplásmico de la proteína PAM se ancla al citoesqueleto a través de la molécula Kalirina (J. y M., 2010).

### 1.3.3 Participación de los canales dependientes de voltaje Kv2 en GSIS

Los canales de potasio dependientes de voltaje son proteínas transmembranales tetraméricas (conformadas por 4 subunidades  $\alpha$ , cada una de las cuales a su vez se compone de 6 dominios transmembranales (C1-C6). El poro de permeabilidad, así como el filtro de permeabilidad selectiva del canal se encuentran ubicados entre el dominio C5 y C6, mientras que el sensor de voltaje, conformado por una cadena de residuos de arginina (con carga positiva) se encuentra en el dominio C4. Dichos canales pertenecen a la subfamilia 2 de los canales de potasio dependientes de voltaje (Kv2), la cual cuenta con 2 miembros (Kv2.1 y Kv2.2) y son codificados por los genes *Kcnb1* y *Kcnb2* respectivamente, ambos genes se encuentran ubicados en el brazo largo del cromosoma 20 (20q 13.13) y en el brazo largo del cromosoma 8 (8q21.11) respectivamente (Zhang *et al.*, 2015).

Los canales de potasio Kv2.1 y Kv2.2 juegan un papel importante en el mantenimiento de la excitabilidad membranal en diversas células, incluyendo células de músculo cardíaco y neuronas (Gravagna *et al.*, 2009). La función clásica descrita para los canales Kv2.1 y Kv2.2 en las células  $\beta$  pancreáticas, es la repolarización del potencial de membrana, lo cual disminuye la actividad eléctrica de dichas células y conlleva al cese de secreción de insulina estimulada por glucosa (Hiriart *et al.*, 2014).



**Figura 2.** Modelo propuesto para la secreción de insulina estimulada por glucosa basado en: Hiriart *et al.*, 2014.

De manera adicional a la función clásica de los canales Kv2, se ha observado que la expresión y agrupación de los canales Kv2.1 en la superficie membranal, tiene un efecto estimulante sobre la secreción de insulina, al facilitar el acoplamiento de las vesículas secretoras de insulina con la membrana plasmática (Fu *et al.*, 2017). Además, se ha demostrado que las proteínas del complejo SNARE interactúan con el extremo carboxilo terminal del canal Kv2.1 (Fu *et al.*, 2017) y tienen acoplamiento físico y funcional con los canales Kv2.

La actividad de los canales Kv2 se encuentra adicionalmente regulada, a través del control del tráfico de las vesículas secretoras que lo contienen, mismas que transitan desde el retículo endoplásmico rugoso hasta su sitio de inserción en la membrana, en donde forman clústeres o agrupaciones (Gravagna y Ribera, 2010). Los canales de potasio Kv2 incluyen diferentes sitios de fosforilación que pueden regular propiedades biofísicas como potencial de activación, el número de canales en la membrana y con ello la densidad de la corriente saliente de potasio (Gravagna y Ribera, 2010). Se ha reportado que la fosforilación de residuos de serina en las regiones citoplásmicas amino y carboxilo terminal del canal Kv2.1 regulan la agrupación (clustering) del canal por un mecanismo dependiente de calcio liberado del retículo endoplásmico (Gravagna y Ribera, 2010).

#### **1.4 Maduración funcional de la célula $\beta$ pancreática**

Como se mencionó anteriormente, las células  $\beta$  pancreáticas maduras secretan insulina de manera robusta, bifásica y responden a cambios en la concentración extracelular de glucosa. Trabajos previos en nuestro laboratorio, han demostrado que desde el nacimiento y hasta alrededor de la etapa del destete (a partir del día 20 posnatal en condiciones de laboratorio) en ratas de la cepa *Wistar*, las células  $\beta$  pancreáticas secretan poca insulina de una manera monofásica y no responde a cambios en la concentración extracelular de glucosa, cuando se compara con las células  $\beta$  pancreáticas de ratas adultas (Aguayo-Mazzucato *et al.*, 2006). Al proceso a través del cual las células  $\beta$  pancreáticas adquieren la capacidad de secretar insulina de manera bifásica y responder a cambios en la concentración extracelular de glucosa se le denomina maduración funcional (Cabrera-Vásquez *et al.*, 2009).

La maduración funcional de la célula  $\beta$  pancreática en las ratas, ocurre durante el primer mes de vida, el cual corresponde a una ventana crítica del desarrollo que incluye procesos biológicos como: el nacimiento, la lactancia y el destete, cada uno representa una fuerza impulsora en la maduración funcional (Aguayo-Mazzucato *et al.*, 2006).

Se ha demostrado que la maduración funcional es un proceso complejo, mismo que implica la activación e inactivación de genes lo cual depende en gran medida de la interacción entre las células  $\beta$  y su microambiente (Olbrot *et al.*, 2002). De esta manera, alteraciones en el medio extracelular, tales como la presencia de hormona tiroidea, o la transición de una dieta basada en leche materna a una dieta rica en carbohidratos (destete), son factores que promueven la maduración de las células  $\beta$  *in vivo* (Aguayo-Mazzucato *et al.*, 2006), (Rovira y Ferrer, 2015)

#### 1.4.1 Etapa neonatal

Dentro de los factores que participan en la maduración funcional neonatal de las células  $\beta$ , destacan la menor expresión del glucotransportador GLUT2 en las células inmaduras en comparación con las maduras y la menor expresión de la subunidad  $\alpha 1$  de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L con la consiguiente menor densidad de corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células inmaduras (Navarro-Tableros *et al.*, 2007). Adicionalmente, en las células  $\beta$  neonatales ha sido posible identificar la expresión de genes tales como *Mmp2*, *Ck-19* y *Spd*, mismos que se encuentran generalmente expresados de manera exclusiva en las células del ducto pancreático (Aye *et al.*, 2010).

Otras moléculas relacionadas con el proceso de maduración funcional en el periodo neonatal incluyen el receptor gamma relacionado con estrógenos  $\gamma$  (ERR  $\gamma$ ), mismo que se encuentra regulado a la alta durante el proceso de maduración de las células  $\beta$ , además de encontrarse ligado con el metabolismo aeróbico mitocondrial, siendo crítico para la transición de los miocardiocitos en desarrollo al metabolismo aeróbico (Yoshihara *et al.*, 2016).

En el caso particular de las células  $\beta$  pancreáticas, estudios de análisis de microarreglo reportan que el receptor gamma relacionado con estrógenos ERR $\gamma$  se encuentra asociado con la regulación de genes que participan en la síntesis de ATP, transporte catiónico, fosforilación oxidativa, transporte de electrones y secreción de insulina, cabe destacar que gran parte de los genes regulados por ERR $\gamma$  se encuentran regulados a la baja en las células  $\beta$  inmaduras (Shirakawa y Kulkarni, 2016).

Durante el periodo neonatal, en los islotes pancreáticos, la expresión de factores de transcripción como *PDX-1*, *NeuroD1*, *Nkx6.1* y *MafA* regula el desarrollo de las células del islote (Oliver-Krasinski y Stoffers, 2008). De igual manera durante el proceso de maduración funcional de la célula  $\beta$ , la expresión del factor de transcripción *MafA* y del gen de la insulina es menor comparada con la expresión de ambos genes en el periodo de adulto, a diferencia de otros factores de transcripción, mismos que para tal periodo ya han alcanzado sus niveles de expresión de adulto. Estas observaciones sugieren el papel preponderante de *MafA* junto con otros factores de transcripción en el proceso de maduración funcional de la célula  $\beta$  (Bonner-Weir, Aguayo-Mazzucato y Weir, 2016).

Otros genes que se han relacionado con la maduración neonatal de las células beta incluyen el gen que codifica para el glucotransportador GLUT2, la glucocinasa, *Glpr1r* y *Pcsk1*. Adicionalmente, genes como el de la malato deshidrogenasa, glicerol 3 fosfato deshidrogenasa, glutamato oxaloacetato deshidrogenasa, glutamato oxaloacetato transaminasa, piruvato carboxilasa y carnitina Palmitoil Transferasa 2 muestran expresión reducida en las células  $\beta$  neonatales con respecto a las adultas, lo cual se encuentra parcialmente relacionado con la menor secreción de insulina estimulada por glucosa observada en el periodo neonatal con respecto al del adulto. Adicionalmente se ha observado menor concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en las células  $\beta$  inmaduras, siendo el calcio un ion esencial para la exocitosis de las vesículas de insulina (Boschero *et al.*, 1992). De igual manera, la expresión de moléculas de adhesión intercelular tales como N-CAM, las cateninas  $\alpha$  y  $\beta$ , ZO-1 y la F-actina es menor en las células inmaduras con respecto a las maduras (Santo-Silva *et al.*, 2012).

Un análisis de transcriptoma hecho en diferentes etapas del desarrollo, en células  $\alpha$  y  $\beta$  demuestra que en etapas iniciales del desarrollo (p0 y etapa prenatal) los genes primordialmente expresados participan en proceso de división celular, mientras que las células  $\beta$  en los días p9 y p15, mostraron expresar genes que juegan papeles fisiológicos tales como regulación de la localización de proteínas en la membrana y vías metabólicas diversas, incluyendo glucólisis y  $\beta$  oxidación, lo cual es consistente con la maduración metabólica y especialización de las células del islote a los días de desarrollo postnatal p9 y p15 (Wei-Lin Q. 2017).

Otro factor descrito en el proceso de maduración de las células  $\beta$  pancreáticas, tanto en islotes de humano como de ratón, es la calcineurina y el factor nuclear de las células T activadas (Cn/NFAT), debido a su papel en la biogénesis de los gránulos secretores, así como en la proliferación celular durante el periodo neonatal (Goodyer *et al.*, 2012). Se tiene evidencia de que durante el crecimiento y maduración neonatal de las células  $\beta$  pancreáticas hay una corriente entrante de  $\text{Ca}^{2+}$  (Navarro-Tableros *et al.*, 2007), sugiriendo que la señalización por Cn/NFAT constituye un factor crucial que enlaza el metabolismo de la glucosa y la homeóstasis de  $[\text{Ca}^{2+}]$  con la regulación transcripcional que promueve la proliferación y maduración en los islotes neonatales (Goodyer *et al.*, 2012). Otro papel descrito para la señalización por Cn/NFAT consiste en la regulación de la expresión en célula  $\beta$  de ratón de los genes *FoxM1* y *CcnA2*, mediadores conocidos de la proliferación en músculo liso y fibroblastos (Karpurapu *et al.*, 2008), además de controlar la expresión de múltiples reguladores adicionales del ciclo celular, esenciales para el mantenimiento de la masa de las células  $\beta$  durante el periodo neonatal (Goodyer *et al.*, 2012).

En el caso particular de los canales de potasio dependientes de voltaje (Kv), poco se sabe sobre su papel en el desarrollo funcional de las células  $\beta$ , sin embargo, en neuronas hipotalámicas, se ha observado un aumento en la expresión de los canales Kv1.2 y Kv1.5, en periodos específicos del desarrollo de dichas neuronas (E8 y E12), estando dicho aumento correlacionado con un aumento proporcional en la corriente saliente de potasio, lo anterior sugiere que tanto Kv1.2 como Kv1.5 juegan un papel importante en el mantenimiento del potencial de membrana en reposo de las neuronas en desarrollo, así como con el desarrollo de circuitos hipotalámicos encargados de regular la homeóstasis energética (Doczi M *et al.*, 2016).

Otro factor de importancia se encuentra conformado por los miembros de la familia CREB/ATF (bZIP), jugando un papel trascendente en la regulación del gen de la insulina. De hecho, el elemento de respuesta a cAMP (CRE), es una de las secuencias más conservadas en el promotor de insulina. Las proteínas CREB/ATF pueden existir en múltiples isoformas que pueden ser activadas por vías de señalización dependientes de AMP cíclico y diacilglicerol, formando complejos con otros factores de transcripción para establecer activadores o represores.

#### **1.4.2 Destete**

El destete, mismo que implica una transición de una dieta rica en ácidos grasos provenientes de la leche materna a una dieta normal rica en carbohidratos facilita la fosforilación oxidativa estimulada por glucosa, secreción de insulina y replicación celular (Rovira y Ferrer, 2015). También se ha reportado que el destete desencadena cambios específicos en la expresión de secuencias de RNA pequeñas no codificantes conocidas como microRNA (miRNA) en el islote (Jacovetti *et al.*, 2015). El aumento en la transcripción de miR-17-5p y mir-181b induce la expresión de la fosfofructocinasa (Pfkp) y el homólogo de tensina fosfatasa (PTEN), lo cual coincide con el periodo del destete. Estos cambios en el microRNA permiten el desarrollo de la secreción de insulina estimulada por glucosa y también limitan la proliferación celular (Dhawan *et al.*, 2015).



Dentro de los miRNA identificados en el proceso de maduración de la célula  $\beta$  pancreática y que regulan la transcripción de los genes *Ins1* e *Ins2* destacan miR-24, miR-26, miR-182 miR-148 y miR-375. Éste último por su parte es requerido para la homeóstasis de la glucosa, por lo que se ha relacionado no solo con la maduración de las células  $\beta$  pancreáticas, si no con las funciones del islote maduro (Correa-Medina *et al.*, 2009). Por su parte miR-7 es el miRNA más abundante en las células endócrinas y su inhibición resulta en disminución en el número de células en el islote, así como intolerancia a la glucosa en el páncreas en desarrollo (Nieto *et al.*, 2012).

Como se puede ver hasta aquí, el proceso de maduración funcional de las células  $\beta$  pancreáticas es altamente complejo y regulado por una amplia variedad de factores de transcripción durante las diferentes etapas del desarrollo postnatal de la rata (nacimiento, lactancia y destete) (Tabla 1).

<b>Gen</b>	<b>Etapa del desarrollo</b>	<b>Papel principal</b>
<b><i>Pdx1</i></b>	Neonatal	Mantenimiento de la identidad de las células $\beta$ pancreáticas a través de la regulación de la expresión de genes como: <i>Ins</i> , <i>Glut2</i> y <i>Gk</i>
<b><i>Foxa2</i></b>	Neonatal	Apertura de cromatina durante la diferenciación de las células $\beta$ , permitiendo la expresión de factores de transcripción reguladores del programa de desarrollo.
<b><i>PP3CC (Calcineurina A <math>\gamma</math>)</i></b>	Neonatal	Proteína sensible a calcio que participa en la proliferación de las células $\beta$ del islote en desarrollo.
<b><i>MafA</i></b>	Neonatal, destete y adulto	Factor de transcripción que regula a la alta la expresión del gen de la insulina y mantiene la identidad de las células $\beta$ maduras
<b><i>Creb/Atd</i></b>	Neonatal, destete y adulto	Regulador positivo de la expresión del gen de la insulina
<b><i>Glut2</i></b>	Neonatal, destete y adulto	Transporte de la glucosa al citoplasma durante GSIS, mayor expresión en las células $\beta$ maduras.
<b><i>Gck</i></b>	Destete y adulto	Cinasa de alta afinidad que participa en la glucolisis, regula el proceso GSIS en las células $\beta$ maduras.

**Tabla1.** Principales genes que participan en el desarrollo funcional de las células  $\beta$  por etapa de desarrollo

## Antecedentes

Con la finalidad de comprender y caracterizar la maduración funcional de la célula  $\beta$  pancreática, en nuestro laboratorio se ha propuesto que existen cambios en los niveles de expresión génica de canales iónicos de calcio relacionados con la secreción de insulina (Navarro-Tableros *et al.*, 2007). Además, se realizó un análisis de transcriptoma a partir de RNA proveniente de células  $\beta$  de 20 días y de adulto (Larqué *et al.*, 2016).

Para el análisis del transcriptoma se utilizó la estrategia de enriquecimiento de genes (GSEA). Tomando como referencia la base de datos Reactome se encontró un cambio significativo en la expresión de genes que participan en procesos fisiológicos diversos tales como el metabolismo y la secreción de insulina (Larqué *et al.*, 2016). De manera particular en este último proceso se observaron cambios significativos en la expresión de los canales de potasio Kv2, particularmente el gen *kcnb2*, que codifica para el canal Kv2.2, tuvo mayor expresión en células adultas, con respecto a las células de 20 días (Larqué *et al.*, 2016).

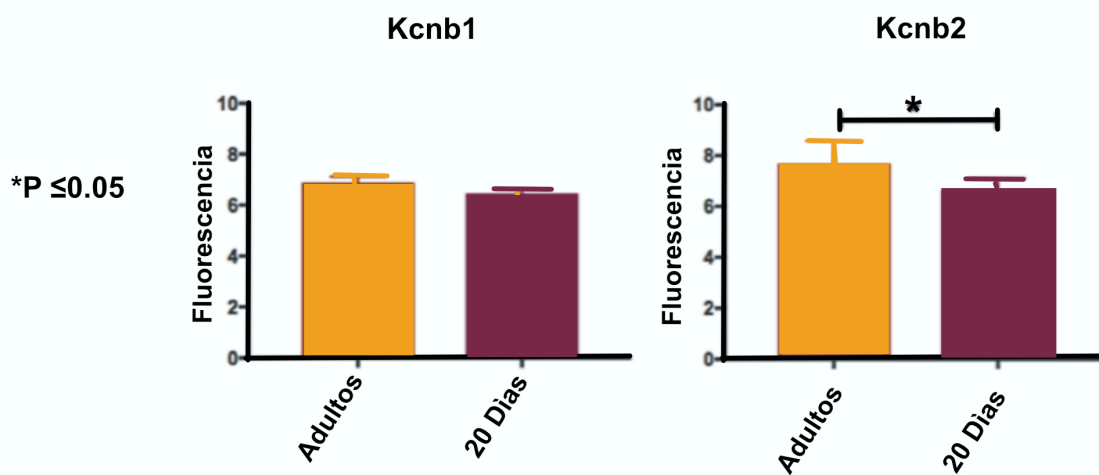
Estudios del transcriptoma de la célula  $\beta$  pancreática madura han demostrado que un conjunto de genes relacionados con la división celular, así como con su control, se encuentran mayormente expresados en las células  $\beta$  inmaduras con respecto a las maduras. Adicionalmente se ha observado en las células maduras, la expresión activa de genes que participan en la fosforilación oxidativa y su regulación, así como genes que expresan neurotransmisores incluyendo GABA, y genes que codifican para canales de potasio (Larqué *et al.*, 2016).

Dentro de los genes descritos durante la maduración funcional postnatal temprana destacan *MafA*, *NeuroD1* y *Ucn3*, adicionalmente dentro de los genes que mostraron expresión diferencial destacan *Mcm7*, *Cdk7* y *Prim1*, mismos que se encuentran clasificados dentro del grupo de enriquecimiento funcional del complejo de replicación, utilizando como referencia la base de datos Reactome (Larqué *et al.*, 2016) (Tabla 1).

Periodo	Grupo de enriquecimiento funcional (Reactome)
<b>Adultos</b> <b>(Células <math>\beta</math> maduras)</b>	REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN CÉLULAS $\beta$ SISTEMA NERVIOSO REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE INSULINA TRANSMISIÓN A TRAVÉS DE LAS SINAPSIS QUÍMICAS INTEGRACIÓN DEL METABOLISMO ENERGÉTICO SÍNTESIS, SECRECIÓN Y RECAPTURA DE GABA CANALES DE POTASIO INTERACCIÓN ENTRE L1 Y ANKIRINAS RORA ACTIVA LA ACTIVACIÓN CIRCADIANA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR DE GABA REGULACIÓN DEL DESARROLLO DE LA CÉLULA $\beta$
<b>20 días</b> <b>(Células <math>\beta</math> inmaduras)</b>	REPLICACIÓN DEL DNA TRANSICIÓN FASES M-M-G1 DE CICLO CELULAR CICLO CELULAR MITOSIS PROMETAFASE PUNTOS DE CONTROL DEL CICLO CELULAR PUNTO DE CONTROL G2-M MANTENIMIENTO DE LOS CROMOSOMAS TRANSICIÓN G1-S FASE S

**Tabla 2.** Grupos de enriquecimiento funcional en los que fueron clasificados los genes que presentaron expresión diferencial entre la etapa de adulto con respecto a la etapa de 20 días, utilizando la base de datos Reactome. A partir de: C. Larqué *Functional maturation of rat beta-cells*.

El análisis de enriquecimiento génico (GSEA), demostró enriquecimiento funcional para los genes que codifican para los canales de potasio sensibles a voltaje *Kcnb1* y *Kcnb2*, de los cuales el gen *Kcnb2* tuvo expresión diferencial entre ejemplares de ratas adultas con respecto a ejemplares de rata de 20 días, presentando mayor expresión en los ejemplares adultos con respecto a los ejemplares de 20 días de manera estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ) (Figura 3).



**Figura 3.** Niveles de expresión de los genes *Kcnb1* y *Kcnb2* entre los ejemplares adultos y de 20 días.

Los factores que regulan la expresión de los canales Kv2 a nivel transcripcional son poco conocidos, sin embargo se ha demostrado que diversas vías de señalización tales como la vía del factor de crecimiento transformante  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ), así como la vía de PI3K-AKT tienen la capacidad de regular la expresión de un conjunto de canales iónicos, mismos que incluyen a los canales de calcio tipo L y los canales de sodio dependientes de voltaje en tejidos animales (músculo cardíaco y neuronas), así como en líneas celulares de músculo esquelético en desarrollo (Ramos-Mondragón, Vega y Avila, 2011).

Se ha demostrado que el factor de crecimiento transformante  $\beta 1$  promueve diversas arritmias cardíacas, incluyendo fibrilación auricular, siendo éste un efecto inducido debido a la acción inhibitoria que TGF- $\beta 1$  tiene sobre la translocación de canales de  $\text{Na}^+$  a la membrana plasmática, además de modular negativamente la actividad de los canales de  $\text{K}^+$  (Ramos-Mondragón, Vega y Avila, 2011). TGF- $\beta 1$  reduce de manera drástica la cantidad de canales de  $\text{Na}^+$  en la membrana, regulando su expresión en los cardiomiocitos de las aurículas cardíacas de ratas neonatales, reduciendo hasta en un 50% la cantidad de canales translocados hacia la membrana plasmática (Ramos-Mondragón, Vega y Avila, 2011).

En el caso de las células del músculo esquelético en desarrollo (indiferenciadas), se ha demostrado que todos los tipos de corrientes entrantes de calcio (transitoria, rápida y lenta) son suprimidos de manera completa ante la presencia de concentraciones nano molares de TGF- $\beta 1$ , sin embargo, cuando se aplica TGF- $\beta 1$  a miocitos diferenciados no se encuentra inhibición en ninguna de las corrientes anteriormente mencionadas (Caffrey, Brown y Schneider, 2018). Cabe destacar que las células musculares maduras cuentan con un subconjunto de canales de calcio funcionales previamente anclados a la membrana, lo que sugiere que TGF- $\beta 1$  no regula de manera directa la actividad de los canales de calcio si no su expresión y translocación a la membrana (Caffrey, Brown y Schneider, 2018).

Dentro de la cascada de señalización conocida para TGF- $\beta 1$ , en la cual el receptor de TGF- $\beta 1$  inicia una cadena de fosforilaciones sobre las proteínas SMAD, existe participación de vías adicionales que son reguladas por TGF- $\beta 1$ , incluyendo la vía de las MAP cinasas (MAPK), acoplada a ERK, de manera directa, a través de la fosforilación de residuos de tirosina en los receptores de TGF- $\beta 1$  y algunos de sus genes blanco tales como *Foxo1* (Rohrschneider *et al.*, 2000). La cascada de señalización inicia debido a la actividad de tirosina cinasa intrínseca de los receptores de TGF- $\beta 1$  y segundos mensajeros tales como Grb2 y SOS, activando la vía de Ras-Erk MAPK (Lee *et al.*, 2001).

Cabe destacar que la vía PI3K-AKT regula una amplia variedad de respuestas celulares, incluyendo la homeóstasis de la glucosa (forma parte de la cascada de señalización de la insulina), proliferación y crecimiento celular, así como la movilidad y supervivencia celular. Ante la presencia de una amplia variedad de estímulos extracelulares, PI3K genera ácidos grasos intermediarios fosforilados (PI (3,4,5) P3 y PI (3,4) P2, mismos que reclutan proteínas blanco con dominios de unión lipídica a la membrana plasmática (Downward 2004). La fosforilación de ácidos grasos de la membrana plasmática es requerida para la activación óptima de AKT. Una vez que AKT es activado tiene la capacidad de fosforilar proteínas blanco que actúan como factores de transcripción, dentro de las que se encuentran los factores de transcripción *Foxo*, *Bax* y *Bad*, así como *Ikk* y *Mdm22*, modulando de esta manera la proliferación y supervivencia celular, así como la expresión de enzimas que participan en vías metabólicas diversas tanto de lípidos como de carbohidratos (Rohrschneider *et al.*, 2000).

Varios blancos de AKT juegan papeles importantes en la regulación del metabolismo celular y de síntesis de proteínas, incluyendo mTOR y GSK-3 $\beta$ . mTOR es una cinasade serina-treonina, que puede ser encontrada en los complejos mTORC1 y mTORC2. Las funciones biológicas de mTORC2 no se encuentran aun totalmente caracterizadas (Bozulic *et al.*, 2009; Zoncu *et al.*, 2011).

Se ha documentado que TGF- $\beta$ 1, en células de miocardio de rata, regula positivamente la expresión del canal de sodio dependiente de voltaje Nav1.5 a través de la vía de señalización PI3K-AKTy del factor de transcripción *Foxo1*, lo que conlleva un aumento en la densidad de la corriente entrante de sodio  $I_{Na^+}$ , en células de miocardio cultivadas en un medio enriquecido con TGF- $\beta$ 1 (Kaur K et al., 2013). De igual manera se encontró que el factor TGF- $\beta$ 1 reduce los niveles de mRNA del gen *Kcnp2* que codifica para la proteína2 de interacción con los canales Kv, así como del gen *Kcnd2*, mismo que codifica para el canal de potasio dependiente de voltaje Kv4.2. Se demostró que la acción regulatoria sobre la expresión de los canales Nav1.5, así como sobre los genes *Kcnd2y Kcnp2*, se lleva a cabo a través de la cascada de señalización PI3K-AKT, así como de su gen blanco *Foxo1*, mismo que actúa como factor de transcripción a través de la interacción de su forma no fosforilada en el núcleo (Kaur et al., 2013).

En el caso de células musculares cardíacas neonatales, se ha demostrado que la exposición a TGF- $\beta$ 1 tiene el efecto opuesto, reduciendo la expresión de los canales Nav1.5 (Ramos-Mondragón, Vega and Avila, 2011). Los resultados contrastantes sobre la regulación de la expresión de los canales de sodio dependientes de voltaje Nav1.5 en células neonatales con respecto a las células de adulto sugieren cambios en la expresión y regulación de la expresión de genes propios del proceso de desarrollo postnatal. Cabe destacar que varios canales iónicos presentan expresión diferencial entre el periodo neonatal y el periodo de adulto, incluyendo los canales dependientes de voltaje Kv4.2, cuya expresión es 6 veces superior en el periodo de adulto con respecto al periodo neonatal. De igual manera algunas de las propiedades electrofisiológicas de los canales de sodio dependientes de voltaje (Nav), tales como su dependencia de voltaje varían en función de la etapa de desarrollo, mostrando un menor voltaje de inactivación en el periodo neonatal con respecto al periodo de adulto en cardiomiocitos de rata (Kupersmidt S et al., 1998).



De igual manera Zhenning y colaboradores demostraron que en neuronas corticales TGF- $\beta$ 1 funge como un factor protector en las neuronas que sufren isquemia, disminuyendo la neurotoxicidad inducida por Ca<sup>2+</sup> ante situaciones de estrés a las que se expongan las neuronas, incluyendo lesiones traumáticas, a través de la vía JNK (jannus cinasas) (Zhenning *et al.*, 2017).

## **Planteamiento del problema**

A pesar del papel fisiológico importante que juegan los canales de potasio dependientes de voltaje Kv2, en el proceso de secreción de insulina estimulada por glucosa en la célula  $\beta$ , se conoce poco sobre la regulación de su expresión a nivel transcripcional, por lo que es relevante conocer los genes que la regulan. De igual manera, dada la existencia de diferencias funcionales en la secreción de insulina en células  $\beta$  provenientes de ratas de 20 días (p20) con respecto a las ratas adultas, es relevante conocer las diferencias transcriptómicas entre ambos periodos con respecto a los genes que regulan la expresión de ambos canales, incluyendo su grado de expresión, fuerza y tipo de interacción mutua (Regulación positiva o negativa).

## **Hipótesis**

Si las células  $\beta$  pancreáticas de ratas adultas se caracterizan por secretar insulina de manera bifásica y responder a cambios en la concentración extracelular de glucosa, entonces se espera que la conectividad entre los genes reguladores de la expresión de los canales Kv2 en células  $\beta$  pancreáticas de rata adulta sea mayor en comparación con las de 20 días.

## Objetivos Generales

Conocer y describir los genes que participan en la expresión de los canales Kv2.1 y Kv2.2 en periodo de 20 días y de adulto, así como su patrón de agrupación y conectividad.

Determinar si genes que codifican para proteínas de la cascada de señalización de TGF- $\beta$ 1 regulan la expresión de los canales Kv2.1 y Kv2.2 en las células  $\beta$  pancreáticas en ambos periodos del desarrollo.

## Objetivos específicos

- 1) Obtener datos con controles de calidad a partir del microarreglo.
- 2) Construir red de coexpresión diferencial a los 20 días y adulto.
  - 2.1 Seleccionar herramienta bioinformática más apropiada para cuantificar la relación existente entre los genes estudiados.
  - 2.2 Utilizar medida de asociación estadística para cuantificar la relación existente entre los genes estudiados.
  - 2.3 Establecer relación entre pares de genes en función de la medida de asociación estadística, a través de un valor umbral previamente escogido.
  - 2.4 Con la herramienta seleccionada interconectar a todos aquellos genes que superen el valor umbral para obtener la red.
- 3) Analizar las características topológicas de la red para obtener información referente a la regulación de la expresión de los canales Kv2.1 y Kv2.2 en periodo de 20 días y de adulto.

- 4) Identificar los conjuntos de genes involucrados en dicha regulación para establecer posibles relaciones funcionales entre procesos fisiológicos diversos

## Metodología

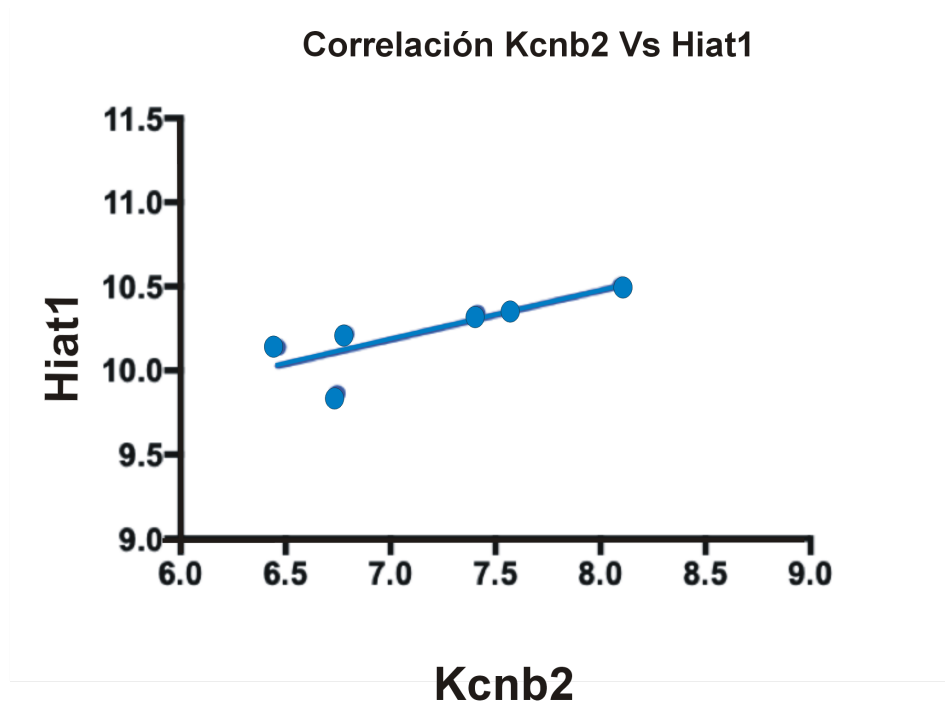
### 1. Obtención y filtrado de datos

Utilizamos los datos del microarreglo (Affymetrix Rat Gene Chip 1.0 ST) realizado por Larqué y colaboradores para células  $\beta$  pancreáticas del día 20 posnatal y adultas (Larqué *et al.*, 2016), con sus respectivos controles de calidad. Los datos fueron obtenidos utilizando el lenguaje de programación R, con el repositorio Bioconductor. Se obtuvieron los niveles de fluorescencia para cada sonda presente en el chip del microarreglo y posteriormente se extrajo la matriz de datos de expresión diferencial con el cálculo del Log Fold Change para ambas condiciones (20 días y adultos), con el objetivo de observar la expresión diferencial entre los genes en estudio.

Posteriormente, entre cada réplica experimental ( $n=3$  réplicas correspondientes al periodo de adulto y  $n=3$  réplicas correspondientes al periodo de 20 días) se calcularon las correlaciones entre la expresión de los genes *Kcnb1* y *Kcnb2* y el resto de los genes analizados en el microarreglo ( $n = 29,214$ ). Para el cálculo de las correlaciones se utilizó el coeficiente de correlación lineal de Pearson y se tomaron en cuenta todos aquellos genes cuya correlación fuera estadísticamente significativa ( $p \leq 0.01$ ), como se ejemplifica en la figura 4. La medida de asociación utilizada (Coeficiente de correlación de Pearson) es válida cuando la distribución de los datos es normal, por lo cual, la normalidad de los datos fue previamente probada utilizando el lenguaje de programación R. La significancia estadística fue calculada con la prueba t de Student (Ecuación 1.1).

$$t = \frac{X - \mu}{S \sqrt{n}} \quad (\text{Ecuación 1.1})$$

Donde:  $X$ = promedio de la variable analizada,  $\mu$ =promedio poblacional de la variable a estudiar,  $S$ = desviación estándar de la muestra y  $n$ = tamaño de muestra (Al-Achi, 2019).



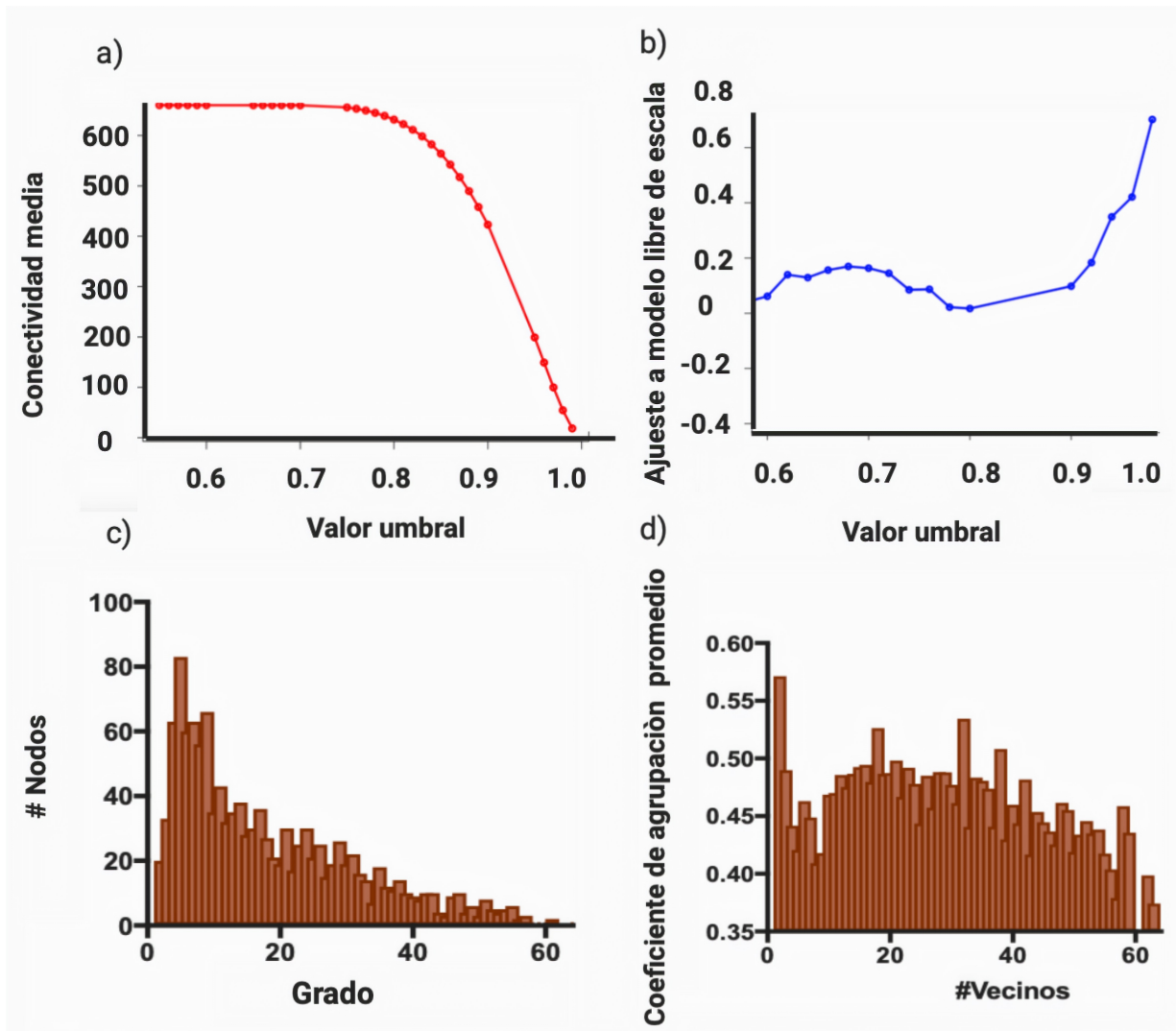
**Figura 4.** Correlación entre el gen *Kcnb2* y *Hiat1* en las 6 réplicas estudiadas (3 en periodo de 20 días y 3 en periodo de adulto)

## 2. Construcción y análisis de las redes de coexpresión para *Kcnb1* y *Kcnb2*

Con el subconjunto de genes que mostraron correlación significativa con los genes estudiados (*Kcnb1* y *Kcnb2*), se realizó la construcción de las redes de coexpresión para cada canal por separado (Figura 6). Para cada red se calculó su coeficiente de agrupación y grado, usando el lenguaje de programación R (Figura 5.). Para la obtención de las matrices de adyacencia correspondientes a cada red se seleccionó un valor umbral de correlación que garantizara la preservación de 2 propiedades (redes libres de escala y de mundo pequeño) características de las redes biológicas, con la finalidad de garantizar la consistencia del análisis, además de tomar en consideración la conectividad media de la red (promedio total de conectores), de manera tal que se obtuvieran redes libres de escala sin comprometer la conectividad (Figura 5). Para el gen *Kcnb2* se evaluaron 5 valores umbrales (0.60, 0.70, 0.80, 0.90 y 0.95), siendo seleccionado el valor de 0.95, tras comprobar que con dicho valor las redes preservan las 2 propiedades anteriormente mencionadas (Figura 5).

Cabe destacar que para cuantificar el ajuste a red libre de escala ( $R^2$ ), se realizó una regresión lineal sobre la transformada logarítmica de la distribución del grado de los nodos (Broido y Clauset, 2019).

Por su parte, para el gen *Kcnb1* se evaluaron 4 valores umbrales (0.60, 0.70, 0.80 y 0.85), siendo seleccionado el valor de 0.85, gracias a la preservación de las propiedades mencionadas anteriormente.



**Figura 5.** Selección del valor umbral y propiedades topológicas de la red con el valor umbral seleccionado (*Kcnb2*) a) conectividad promedio, expresada como el promedio de conectores presentes en la red para cada valor umbral de correlación, b) ajuste a modelo

libre de escala para cada valor umbral explorado ( $R^2$ , c) propiedades topológicas de la red (distribución de grado y de coeficiente de agrupación promedio para el valor umbral seleccionado (0.95).

Usamos el software Cytoscape para visualizar y agrupar (formar clústers) de ambas redes obtenidas. Para obtener el agrupamiento se calculó el coeficiente de agrupación de cada nodo, así como la densidad del gráfico. El cálculo del coeficiente de agrupación se llevó a cabo con la siguiente ecuación:

$$C_i = 2n / k_i(K_i - 1) \text{ (Ecuación 1.2)}$$

Donde  $K_i$  es el tamaño de los nodos colindantes con el nodo  $i$  (nodo de interés) y  $n$  corresponde al número total de nodos estudiados.

La densidad de un gráfico,  $G = (V, E)$ , con un número de vértices (nodos),  $|V|$  y un número de conectores,  $|E|$ , es definida como  $|E|$ ; dividido entre el número máximo teórico de conectores posibles para el gráfico  $G$ ,  $|E|_{\max}$ . (Bader y Hogue, 2003).

Cuando un nodo tiene conexión consigo mismo (nodo original emergente) se dice que la red presenta bucles. Para una red con bucles  $|E|_{\max} = |V| (|V| + 1) / 2$  y para una red sin bucles  $|E|_{\max} = |V| (|V| - 1) / 2$ , de esta manera la densidad de la red ( $G$ ) quedó definida por la expresión  $D_G = |E| / |E|_{\max}$ , siendo un número real que puede tomar valores entre el 0.0 y 1.0 (Bader y Hogue, 2003).

Al estudiar la coexpresión de genes, se puede establecer la conexión de un nodo con otros, pero también se puede calcular la intensidad de esta conexión, asignando un valor o “peso” a cada conector que estableciera contacto con cada nodo estudiado.



Con la densidad local de la red se procedió a “pesar” o asignar valores a todos los nodos en función de la densidad local de la red, utilizando el valor K core más alto de los nodos vecinos al nodo analizado. Un K core se definió como un subgráfico de grado mínimo K (Gráfico G, para cada V (vértice) en G,  $\text{deg}(v) \geq K$ ). El valor del K core más alto representa a la subred central más densamente conectada.

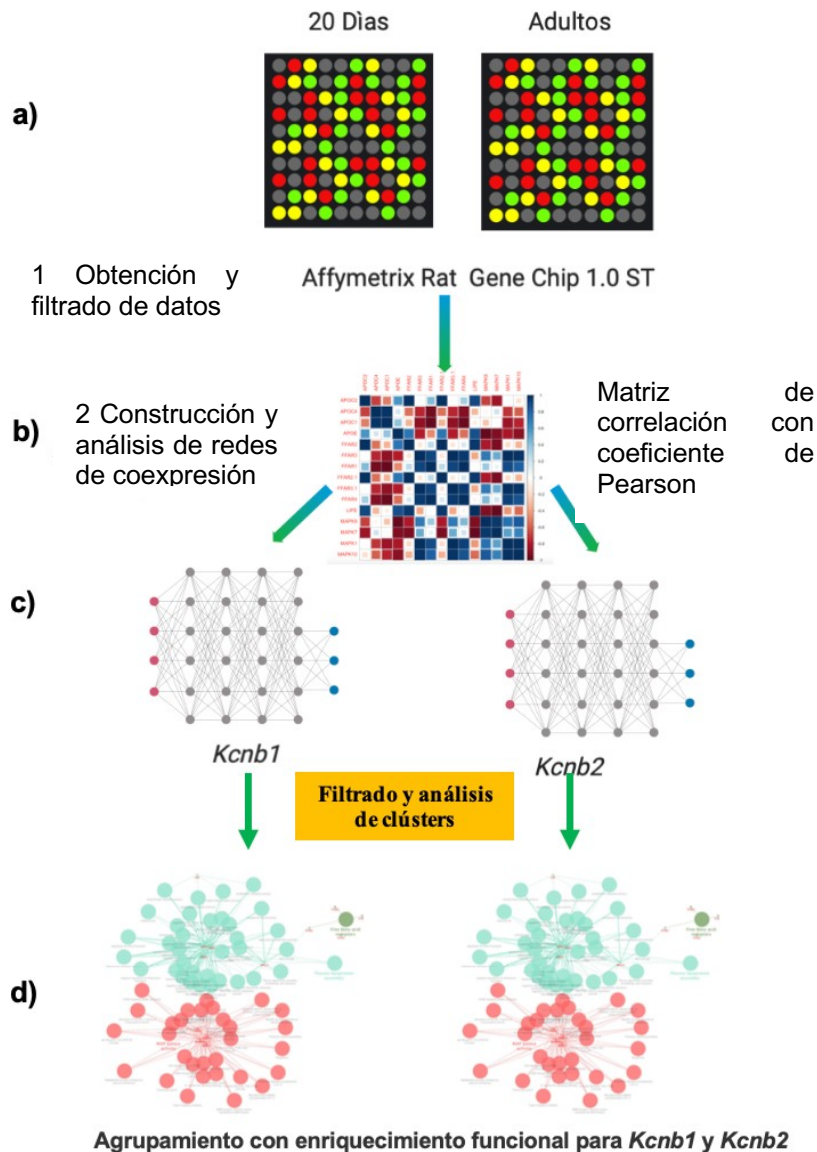
Cabe destacar que las redes libres de escala poseen una distribución de frecuencias de conectividad que sigue una ley de potencia (“Power Law”), lo cual se traduce en muy pocos nodos altamente conectados (alto grado) y muchos nodos poco conectados (bajo grado). De esta manera un nodo altamente conectado (V), en una región con alta densidad de un gráfico puede estar relacionado con varios nodos de grado 1. Cada uno de los nodos que se conectan de manera exclusiva con V no interactúan entre sí.

### **3. Obtención y análisis de redes regulatorias**

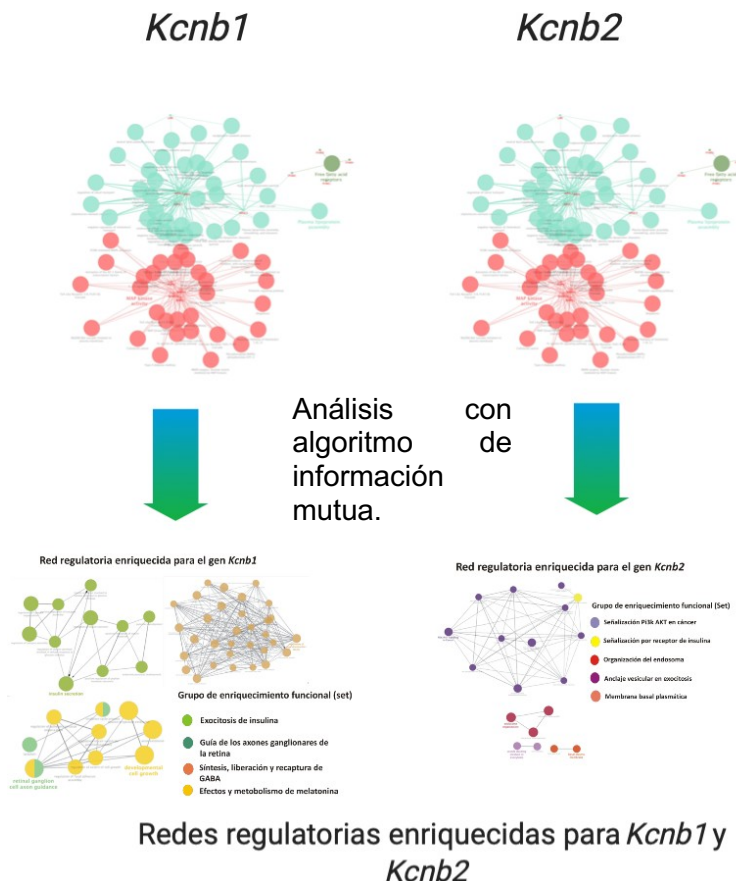
#### **3.1 Análisis de información mutua**

Con los clústers (grupos) obtenidos, se procedió a identificar genes candidatos a fungir como reguladores de la expresión de ambos canales, para lo cual se utilizó el algoritmo “ARACNE” (algoritmo para la reconstrucción de redes celulares), mismo que permite en función de las propiedades topológicas de cada red, predecir interacciones de alta probabilidad entre posibles factores de transcripción o genes reguladores con sus genes blanco (Margolin *et al.*, 2016). De manera inicial, a través de la utilización de ARACNE se identificó la regulación ejercida por un grupo de genes, sobre la expresión de ambos canales, a través de información mutua. Cabe destacar que para la implementación del algoritmo “ARACNE” se utilizó el software Cytoscape y el paquete “ARACNE” versión 1.0 beta 1.

Con las redes de regulación obtenidas a través de ARACNE se llevó a cabo análisis de enriquecimiento funcional, con la finalidad de clasificar los genes en función de su papel fisiológico, para el análisis de enriquecimiento funcional se utilizó el software Cytoscape versión 3.5.1 y el paquete “Cluego” versión 2.5.4 y se emplearon las bases de datos “Reactome”, “Wikipathways” y “GO\_Biological process” (Figura 7).



**Figura 6.** Procedimiento seguido para la obtención de redes de coexpresión a partir de los genes con correlación significativa para *Kcnb1* y *kcnb2* a) se obtuvieron los datos a partir del microarreglo, b) se calculó la correlación entre *Kcnb1* y *Kcnb2* y el resto de genes del microarreglo, c) con los genes que presentaron correlación significativa se construyeron las redes de coexpresión correspondientes, d) a partir de las redes de coexpresión obtenidas se llevó a cabo agrupamiento con enriquecimiento funcional.



Grupos con enriquecimiento funcional para ambos genes de interés.

**Figura 7.** Con los grupos de enriquecimiento funcional para *Kcnb1* y *Kcnb2* se llevó a cabo análisis con algoritmo de información mutua, para obtener las redes regulatorias enriquecidas.

## 3.2 Redes bayesianas

A partir de los 4 conjuntos de genes reguladores con mayor enriquecimiento, se procedió a construir red bayesiana dirigida para cada conjunto, además de red bayesiana diferencial para la etapa de 20 días y de adultos, para lo cual se utilizó el lenguaje de programación R y el paquete “BNArray”, mismo que permite conocer los genes que regulan la expresión del gen de interés de manera directa, así como la direccionalidad de la red, haciendo uso del teorema de Bayes y la dependencia probabilística (Langsfelder *et al.*, 2008). Cabe destacar que el teorema de Bayes, establece relaciones de dependencia/independencia probabilística entre un conjunto de variables aleatorias con respecto a una variable de interés (Expresión del gen estudiado) (Figura 8).

Siendo  $D = (V, E)$  una red dirigida, donde  $V$  es un conjunto finito de nodos y  $E$  es un conjunto finito de conectores dirigidos entre los nodos, la red dirigida define la estructura de la red bayesiana. A cada nodo  $v \in V$  dentro de la red le corresponde una variable aleatoria  $X_v$  (nivel de expresión de cada gen analizado). El conjunto de variables asociadas con la red  $D$  es por ende  $X = (X_v)_{v \in V}$  (Bøttcher y Dethlefsen, 2003). Para cada nodo  $V$  con nodos asociados  $pa(v)$  se encuentra asociada una distribución de probabilidades  $p(X_v | X_{pa(v)})$ . El conjunto de distribuciones probabilísticas para todas las variables dentro de la red es  $\mathbf{P}$ , y una red bayesiana para un conjunto de variables aleatorias (niveles de expresión de genes)  $X$  es el par  $(D, P)$ . La posible falta de conectores dirigidos en  $\mathbf{D}$  determina independencias condicionales entre las variables aleatorias  $\mathbf{X}$  a través de la factorización de la distribución de probabilidades asociadas (Ecuación 1.3) (Bøttcher y Dethlefsen, 2003).

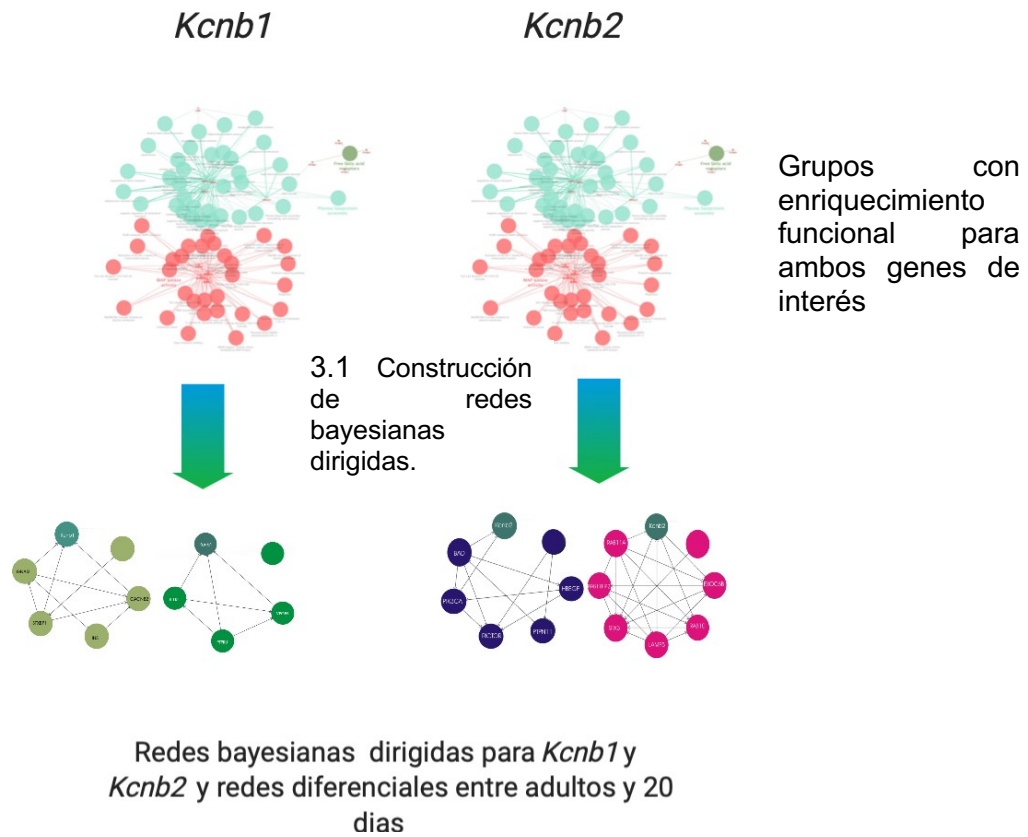
$$p(X) = \prod_{v \in V} p(X_v | X_{pa(v)}) \quad (\text{Ecuación 1.3})$$

De acuerdo con este modelo las variables utilizadas para la construcción de las redes bayesianas pueden ser discretas y continuas, de manera tal que el conjunto de nodos se encuentra definido por  $V = \Delta \cup \Gamma$  donde  $\Delta$  y  $\Gamma$  son los conjuntos de nodos discretos y continuos. El conjunto de variables  $\mathbf{X}$  pueden por lo tanto ser denotadas como:

$$\mathbf{X} = (X_v)_{v \in V} = (I, Y) = ((I_\delta)_{\delta \in \Delta}, (Y_\gamma)_{\gamma \in \Gamma}) \text{ (Ecuación 1.4)}$$

donde  $I$  e  $Y$  son los conjuntos de las variables discretas y continuas respectivamente (Bøttcher and Dethlefsen, 2003).

Con las redes bayesianas construidas para ambos genes de interés (*Kcnc1* y *Kcnc2*) se procedió a realizar análisis de coexpresión diferencial para la etapa de 20 días y de adulto, haciendo uso de coeficiente de correlación de Pearson, obteniendo 2 matrices de correlación para cada etapa y una matriz de correlación diferencial. Para cada matriz se obtuvieron mapas de calor para facilitar la visualización de las correlaciones. Con la matriz de correlación diferencial se construyó una red de coexpresión diferencial para ambos genes de interés (*Kcnc1* y *Kcnc2*) (Figura 8).



**Figura 8.** A partir de los grupos de enriquecimiento funcional para *Kcnb1* y *Kcnb2* se procedieron a construir redes bayesianas dirigidas con la finalidad de encontrar genes reguladores a nivel transcripcional para ambos genes.

### 3.3 Redes de coexpresión pesadas con algoritmo WGCNA

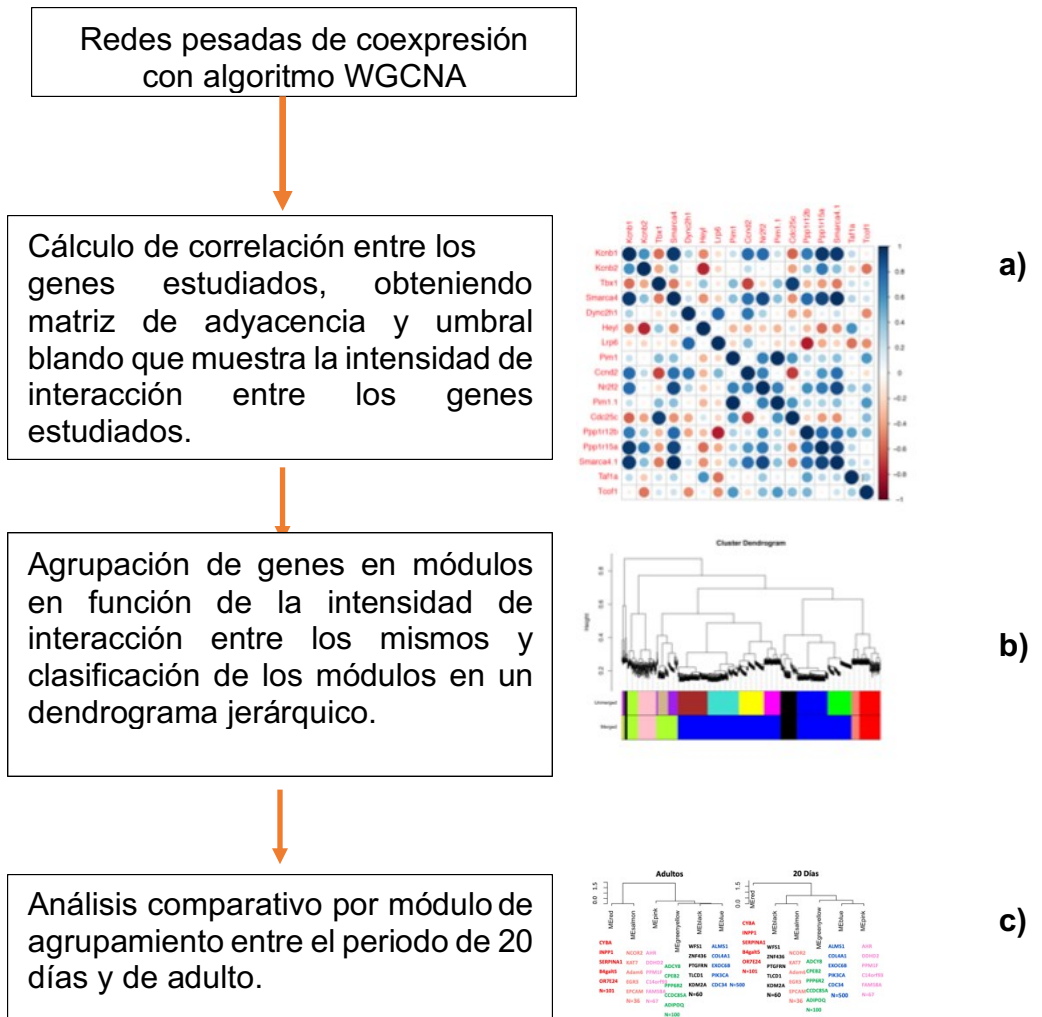
Para corroborar los resultados obtenidos a través de los métodos anteriores se procedieron a construir redes de coexpresión pesadas (“Weighted”), haciendo uso del algoritmo “WGCNA”, mismo que tiene la ventaja de cuantificar la fuerza de interacción regulatoria entre los genes en estudio, además de clasificar a los genes en función de su fuerza de interacción y patrón de correlación, a través de su agrupamiento jerárquico en un dendrograma (Chen *et al.*, 2006). El algoritmo WGCNA parte del cálculo de las correlaciones entre los genes estudiados a través del coeficiente de correlación de Pearson y posteriormente se construye una matriz de adyacencia utilizando un valor de umbral blando ( $\beta$ ), con el cual la similitud por coexpresión es cuantificada (ecuación 1.5). (Song, Langfelder y Horvath, 2012)

$$a_{ij} = \left( \frac{1 + \text{cor}(x_i, x_j)}{2} \right)^\beta \quad (\text{Ecuación 1.5})$$

A partir de la matriz de adyacencia se construyó una matriz de sobre posición topológica (“Topological overlap matrix”), tomando en consideración las características estructurales de la red en cuestión.

Finalmente se construyó un dendrograma que mostrara el agrupamiento jerárquico entre los genes estudiados. La ventaja de la implementación de esta técnica sobre las redes de coexpresión convencionales implica la posibilidad de agrupar los genes analizados en módulos de agrupación, los cuales pueden posteriormente ser clasificados con análisis de enriquecimiento funcional y de agruparlos en un dendrograma en función de la fuerza de interacción entre ellos (red pesada), así como de su patrón de agrupación en la red para cada canal estudiado y para cada periodo estudiado.

Se obtuvieron dendrogramas diferenciales para la etapa de 20 días y de adulto, con la finalidad de identificar módulos cuyo patrón de expresión representara al periodo de 20 días o de adulto y finalmente se construyeron mapas de calor diferenciales con la finalidad de facilitar la visualización de los datos (Figura 9).

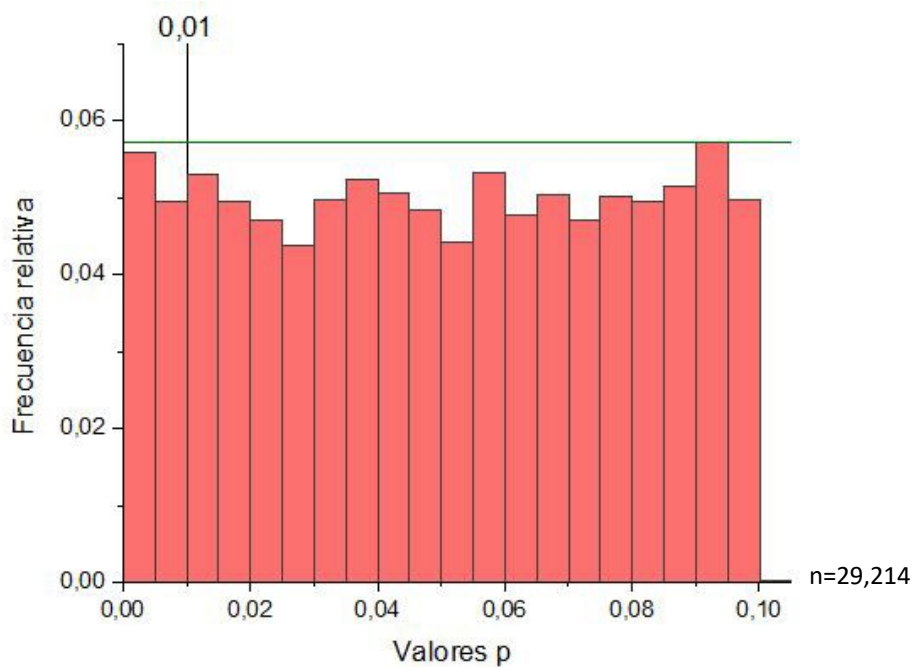


**Figura 9.** a) Mapa de calor con matriz de adyacencia y matriz de sobre posición topológica, b) dendrograma con módulos de agrupación, c) Análisis comparativo por módulo de agrupamiento entre las etapas de p20 y de adulto.



## Resultados

De un total de 29,214 sondas analizadas en el microarreglo, 2,881 y 1,255 genes mostraron correlación estadísticamente significativa con los genes *Kcnb1* y *Kcnb2* respectivamente. En la figura 10 se muestra el cálculo de los valores P de cada correlación y se seleccionaron aquellos genes cuyo valor P fuera  $<0.01$ , con el fin de analizar solamente genes correlacionados de manera significativa (datos presentes a la izquierda de la línea).



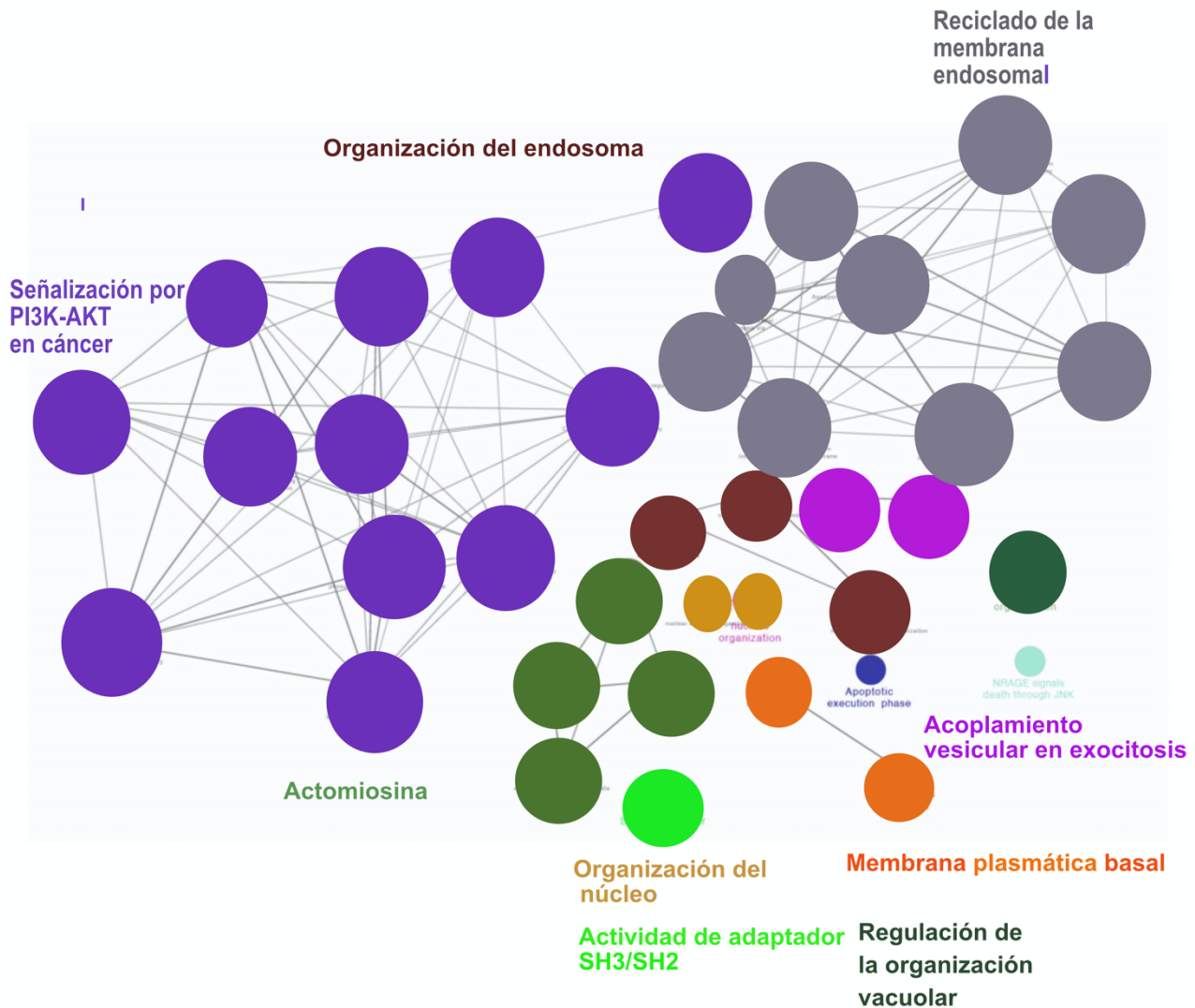
**Figura 10.** Histograma de distribución de los valores de P de los genes correlacionados con la expresión del gen *Kcnb2*

Con respecto a la red de coexpresión para *Kcnb1* se encontraron genes relacionados con la exocitosis de insulina (*Gacnb2*, *Gna12* y *Stxbp1*) y el desarrollo neuronal (*Efna5*, *Nrcam*, *Slit1*, *Vefga*). Otro de los clústeres analizados mostró genes que participan en la división celular (*Aurka*, *Kif11* y *Ranbp11*), así como el metabolismo de los ácidos nucleicos (*Dctp1*, *Shmt1* y *Tdg*).

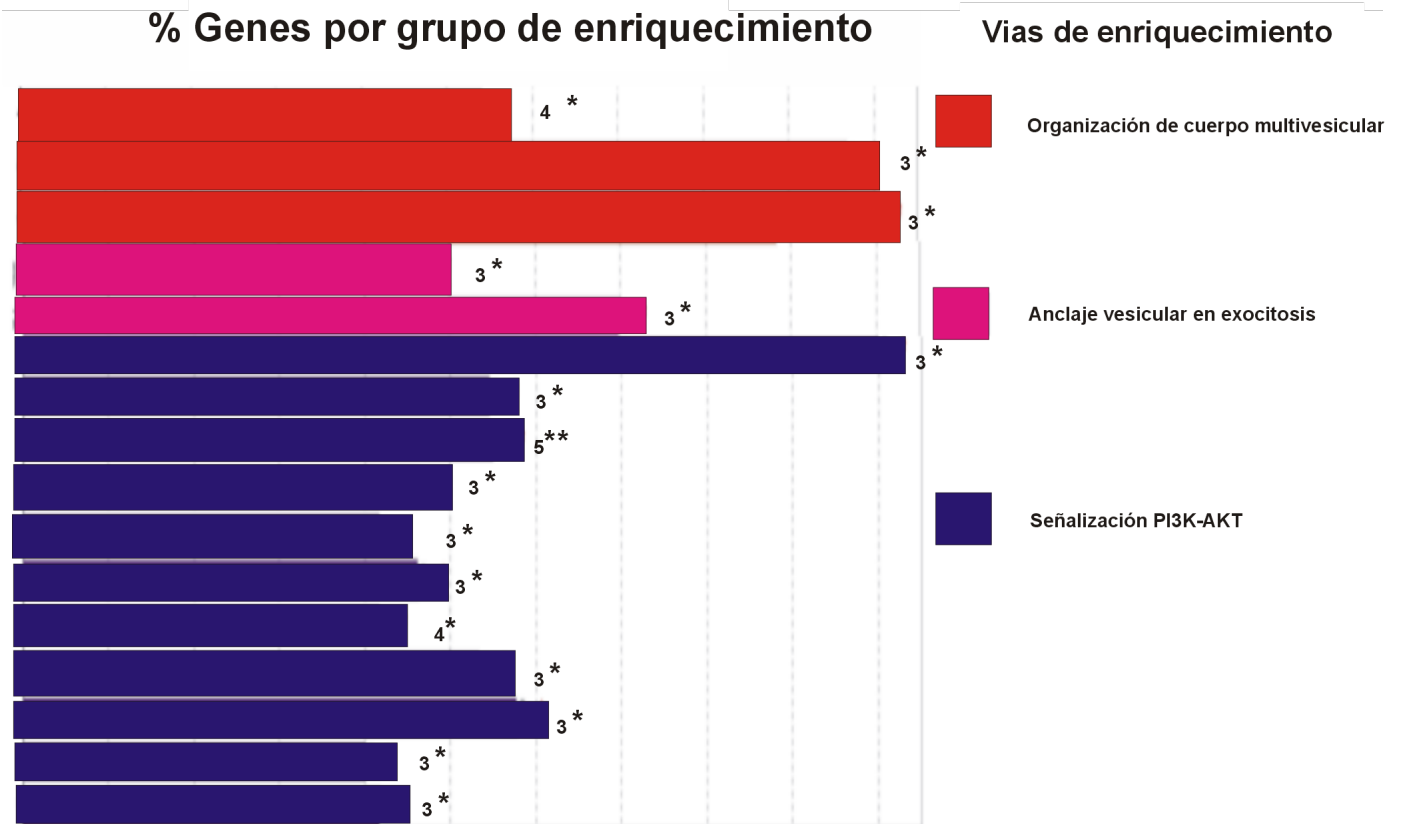
Con respecto a la red para *Kcnb2* se encontraron genes reguladores del metabolismo y efectos de la melatonina (*Csnk1d*, *Pip5k1b* y *Prkca*) así como acoplamiento vesicular en la exocitosis (*Exoc6b*, *Rab10* y *Unc13b*).

Con la aplicación del algoritmo “ARACNE” para la identificación de genes reguladores se identificaron 73 genes reguladores para *Kcnb2*, mismos que interactúan a través de 234 conectores con sus nodos vecinos. Tomando como referencia la conectividad de cada gen destacan *Pk3ca*, *Foxo1*, *Rab11a* y *Scarb2* (Figura 11). Catalítica

a)



b)



**Figura 11.** a) Red regulatoria de la expresión del gen *Kcnb2* construida con el algoritmo “ARACNE” con enriquecimiento funcional n= 73 (cada nodo representa un grupo de genes que tienen un grupo de enriquecimiento en común) b) Lista con selección de grupos y subgrupos enriquecidos junto con el porcentaje de genes enriquecidos en cada subgrupo. Red construida con el algoritmo “ARACNE”.

## 1. Redes bayesianas

A partir de los 4 sets de genes reguladores con mayor enriquecimiento, se procedió a construir red bayesiana dirigida para cada set, además de red bayesiana diferencial para la etapa de 20 días y de adulto (Figura 12).

De acuerdo con el modelo de red bayesiana, la expresión del gen *Kcnb2* es regulada directamente por los genes *Bad*, *Pik3ca* (grupo funcional señalización en cáncer por PI3K-AKT), *Rab11a* (grupo funcional “Organización del endosoma”) y PI3K (grupo funcional “señalización por el receptor de insulina”) (Figura 12 y Tabla 3).

El mismo procedimiento se realizó para el canal Kv2.1 (*Kcnb1*), encontrando un total de n = 161 genes candidatos a ejercer regulación, mismos que interactúan con sus nodos vecinos a través de 2,550 conectores, destacan por su conectividad dentro de la red los genes *Foxo1*, *Cacnb2*, *Vegfa*, y *Gnai2* (Figura13).

El análisis de enriquecimiento funcional mostró que los grupos funcionales (sets) con mayor número de genes enriquecidos fueron: “Exocitosis de insulina”, “Guía de los axones ganglionares de la retina”, “síntesis, recaptura y liberación de GABA” y “efecto y metabolismo de la melatonina”.

A continuación, se procedió a construir red bayesiana, siguiendo la metodología mencionada anteriormente, se encontró que la expresión del gen *Kcnb1* es regulada por algunos genes de cada uno de los sets (grupo funcional). De esta manera los genes *Gnai2* y *Stxbp1* (“Exocitosis de insulina”), *Ilr1*, *Ptprj*, *Vegfa* (“Guía de los axones retinianos”), *Gad2* (“Síntesis, recaptura y degradación de GABA”) y *Map2*, *Ece1* y *Csnk1d* (“Efectos y metabolismo de la melatonina”) resultaron regular la expresión de *Kcnb1* (Figura 14 y Tabla 4).

## **2. Análisis de coexpresión diferencial (Adultos y 20 días)**

Los mapas de calor que representan la correlación entre los genes reguladores de la expresión del gen *Kcnb1* muestran que durante la etapa de adulto los genes reguladores cuentan con mayor correlación mutua en comparación con la etapa de 20 días (Figura 15 a).

Con la matriz de correlación diferencial se construyó una red de coexpresión diferencial para ambos genes de interés (*Kcnb1* y *Kcnb2*).

La red de coexpresión diferencial para *Kcnb1* muestra que los genes *Ins* e *Ilr1* tuvieron mayor expresión diferencial con respecto al resto de genes estudiados (posición central y mayor conectividad dentro de la red) (Figura 15 b).

De manera análoga, al realizar el análisis de coexpresión diferencial para *Kcnb2* los mapas de calor muestran mayor correlación mutua entre todos los genes analizados en el periodo de adulto con respecto al periodo de 20 días (Figura 15 c). Por su parte la red de coexpresión diferencial para *Kcnb2* muestra que los genes *Ptpn11*, *Stx3*, *Exoc6B*, *Kcnb2* y *Scarb2* tuvieron mayor grado de coexpresión diferencial entre ambos periodos estudiados (Figura 15 d).

## **3. Redes de coexpresión pesadas (“Weighted”) con algoritmo WCGNA (*Kcnb2*)**

El agrupamiento jerárquico para los genes regulatorios del gen *Kcnb2* muestra 6 módulos de agrupamiento, a partir de cada módulo se llevó a cabo análisis de enriquecimiento funcional, en el que el modulo azul presentó mayor porcentaje de genes enriquecidos. Los grupos de enriquecimiento funcional para el modulo azul fueron “Ciclo celular y mitosis”, “Señalización por tirosina cinasa”, “acoplamiento membranal” y “Pip3 activa la señalización por PI3K. (Figura 16).

El análisis diferencial muestra que los módulos azul rosa y rojo presentaron mayor diferencia de coexpresión, además de que dichos módulos están más fuertemente correlacionados en periodo de adultos con respecto al periodo de 20 días (Figura 16).

#### **4. Redes de coexpresión pesadas (“Weighted”) con algoritmo WCGNA (*Kcnc1*)**

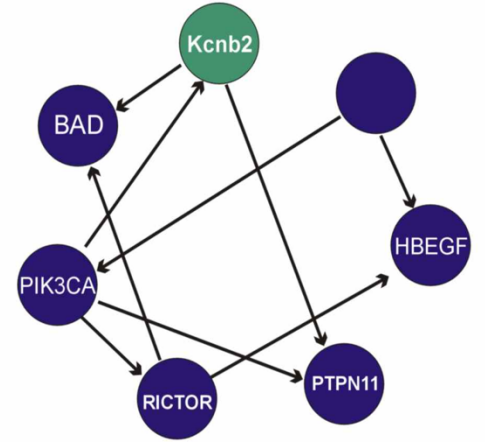
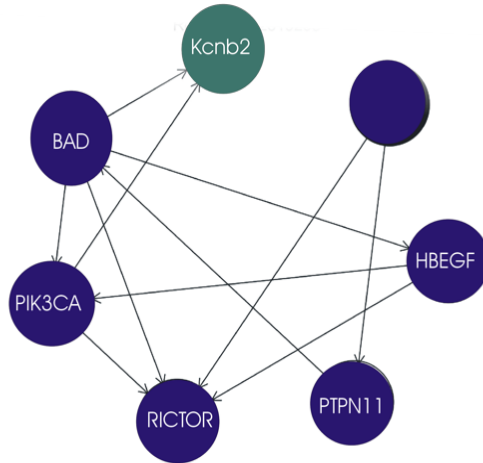
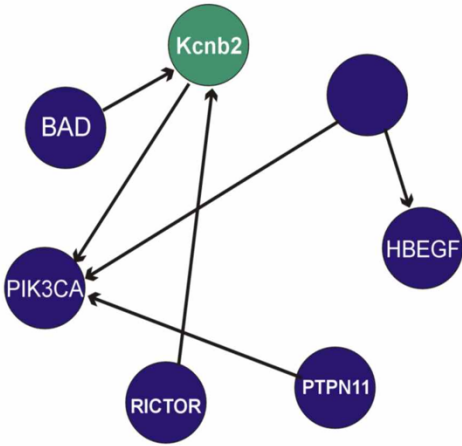
El agrupamiento jerárquico para los genes reguladores del gen *Kcnc1* muestra 7 módulos de agrupamiento, a partir de cada módulo se llevó a cabo análisis de enriquecimiento funcional, en el que el módulo amarillo presento mayor porcentaje de genes enriquecidos. Los grupos de enriquecimiento funcional para el modulo amarillo fueron “Regulación de la señalización”, “Homeostasis de la glucosa”, “Regulación del transporte de calcio” y “localización de las vesículas sinápticas” (Figura 17)

Adultos

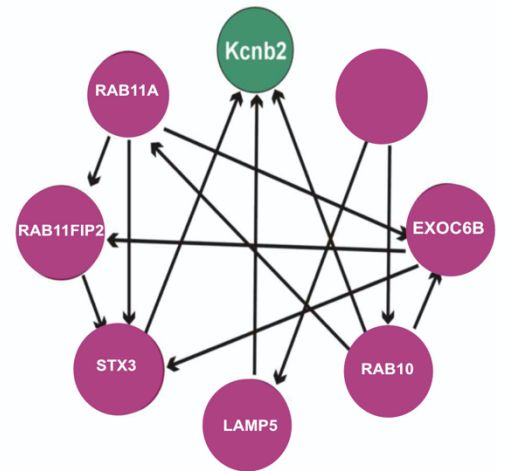
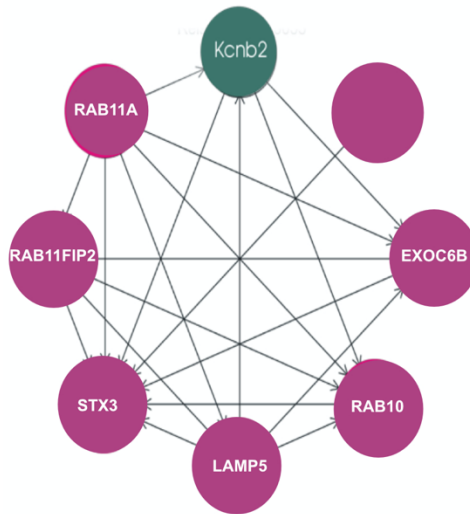
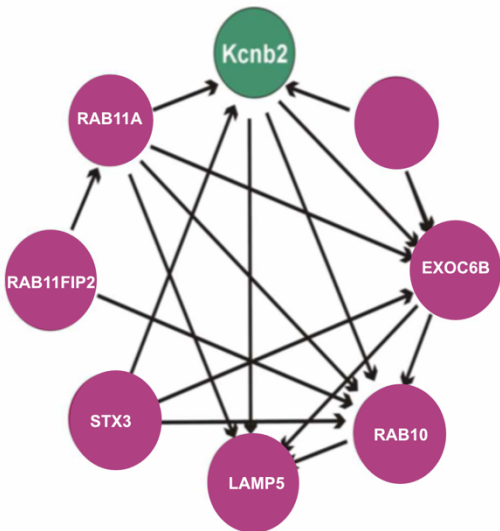
Diferencial

20 días

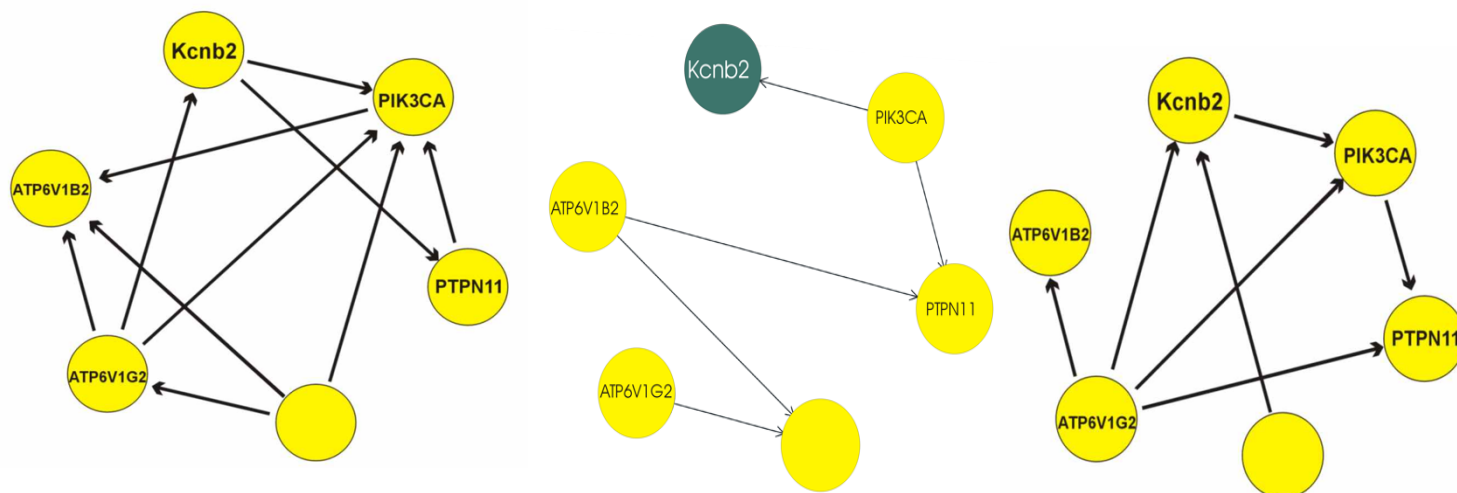
### Señalización PI3K-AKT en cáncer



### Anclaje vesicular en exocitosis



## Señalización del receptor de insulina



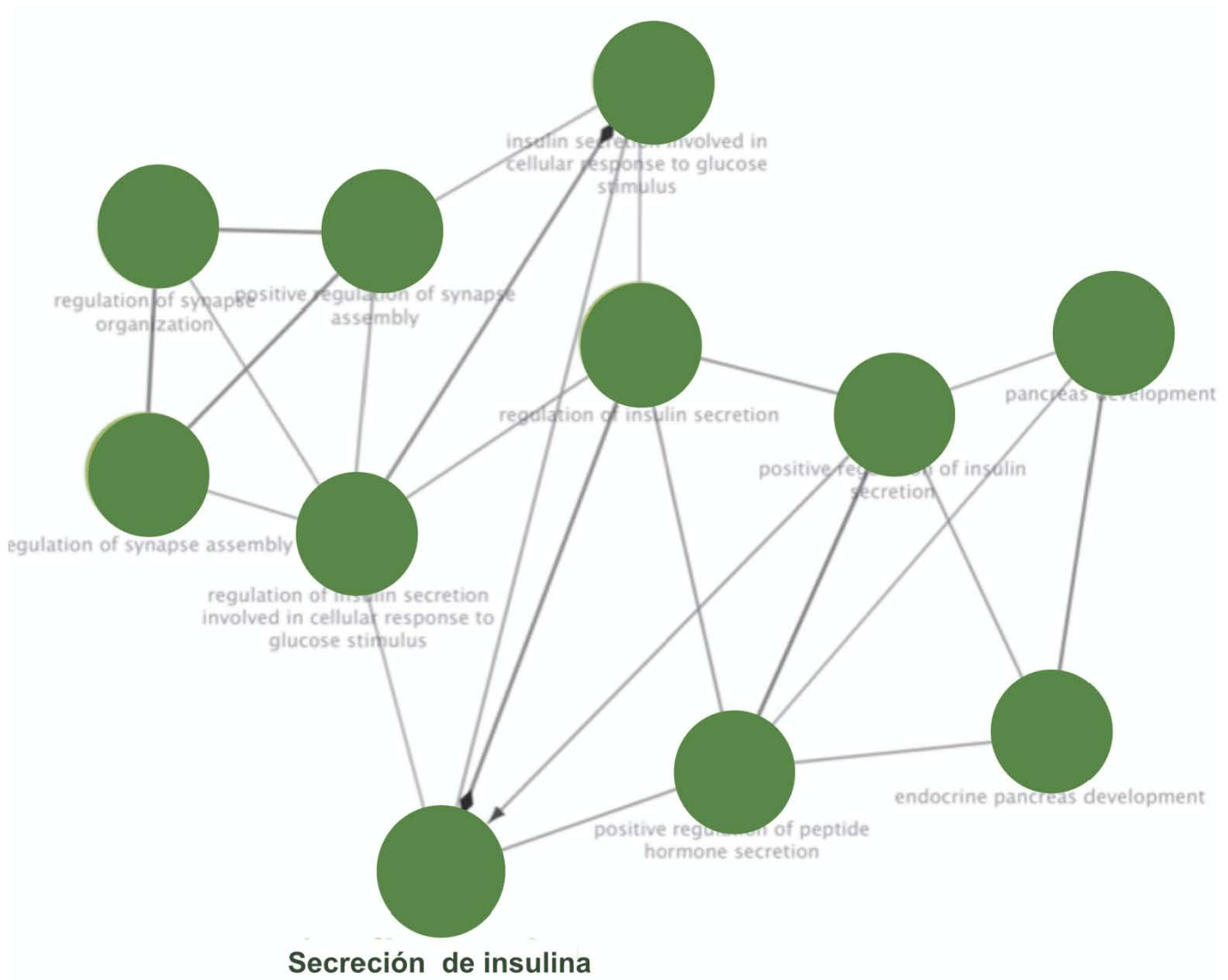
**Figura 12.** Redes bayesianas dirigidas para cada grupo de enriquecimiento funcional y periodo de análisis (20 días o adultos), así como redes diferenciales para *Kcnb2*.

Set funcional	Base de datos	% Genes	Genes
“Señalización por vía PI3K-AKT”	“Reactome”	10%	HBEGF PTPN11 RICTOR <b>PIK3CA</b> <b>BAD</b>
“Acoplamiento vesicular en la exocitosis ”	”Reactome”	9.6%	EXOC6B RAB10 <b>LAMP5</b> STX3 RAB11FIP2 <b>RAB11A</b>
“Organización del endosoma”	“Reactome”	7%	SCARB2 <b>RAB11A</b> PDCD6IP <b>CHMP7</b>

**Tabla 3.** Grupos de enriquecimiento funcional junto con los genes enriquecidos por grupo correlacionados con *Kcnb2*, los genes marcados con rojo representan genes que regulan de manera directa la expresión de *Kcnb2* tanto de manera positiva como negativa en el transcriptoma.

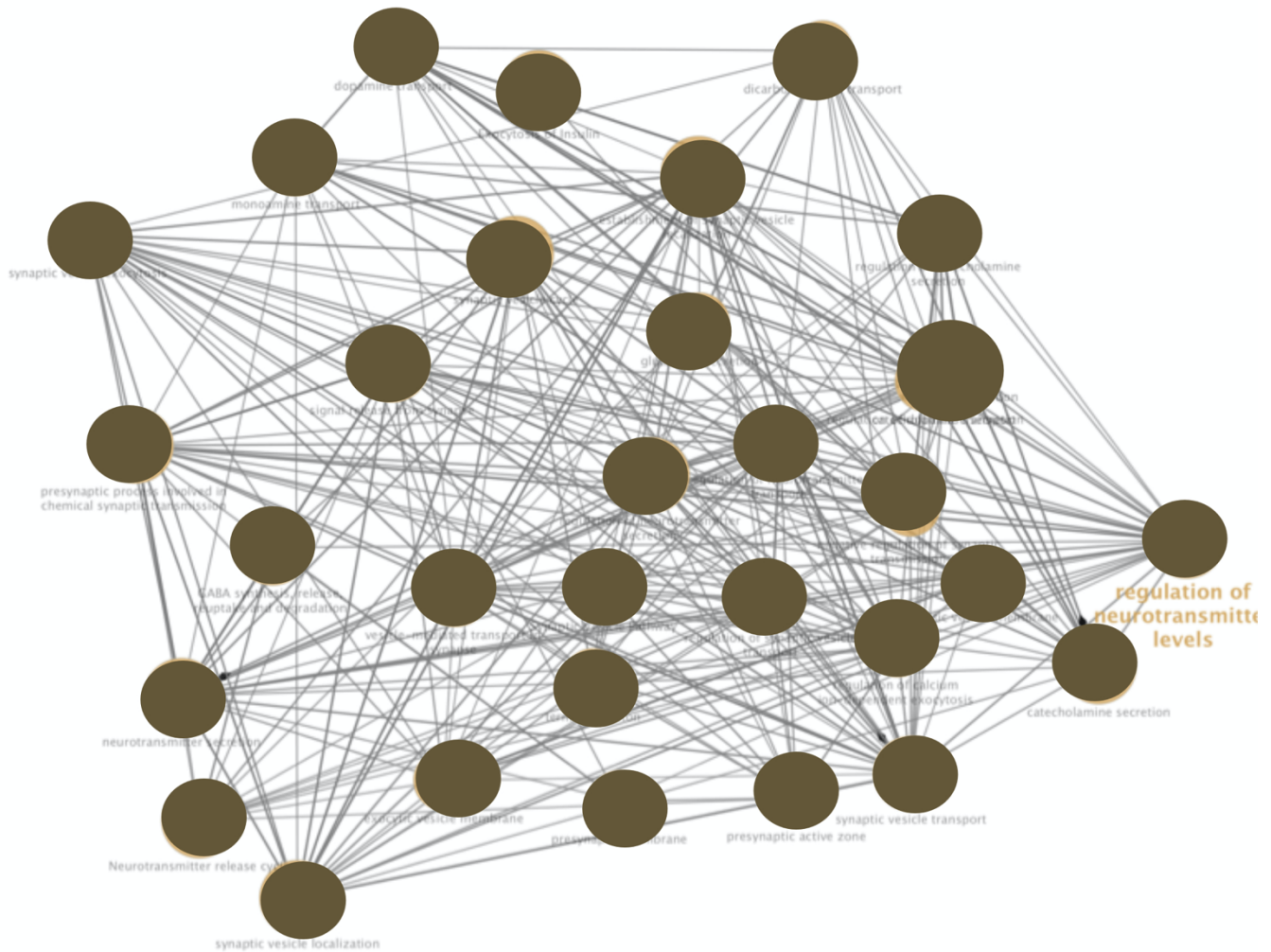


a)



b)

## Regulación de los niveles de neurotransmisores



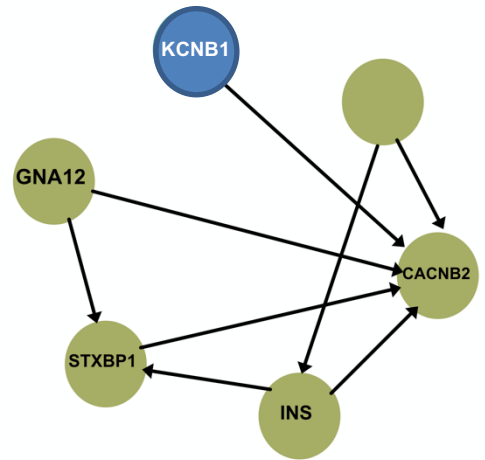
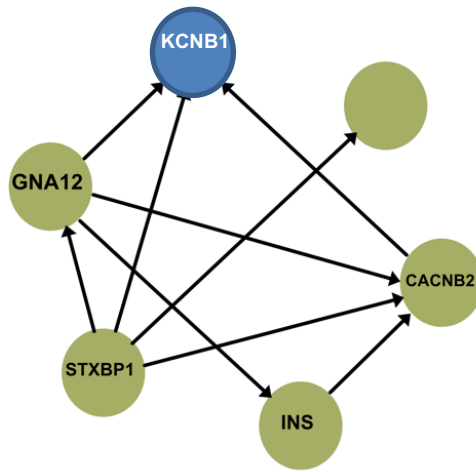
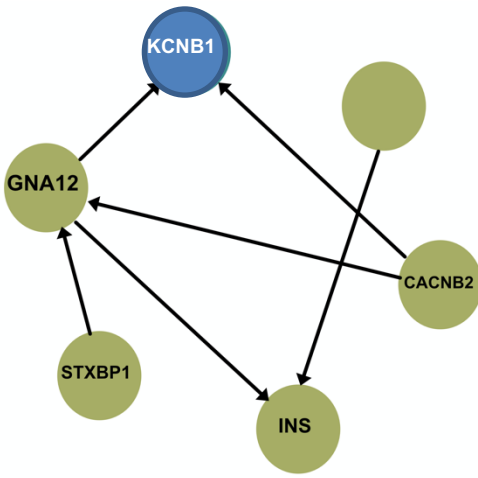
**Figura 13.** Red regulatoria de la expresión del gen *Kcnb1* construida con el algoritmo ARACNE con enriquecimiento funcional n= 161 (cada nodo representa un conjunto de genes que tienen un grupo de enriquecimiento en común) Red construida con el algoritmo “ARACNE”. Los grupos de enriquecimiento funcional fueron: a) secreción de insulina y b) regulación de los niveles de neurotransmisor.

Adultos

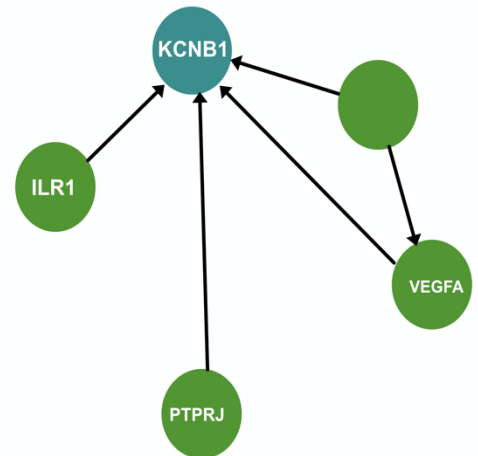
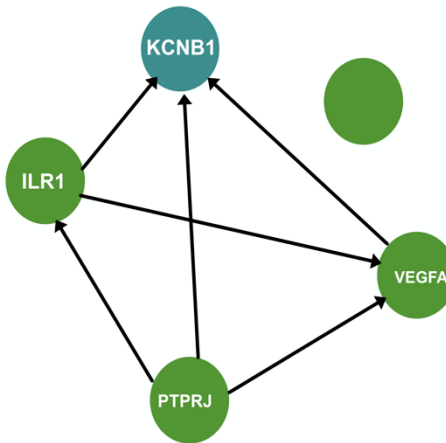
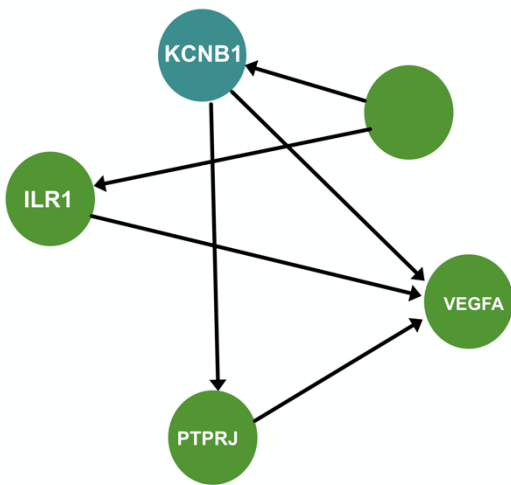
Diferencial

20 días

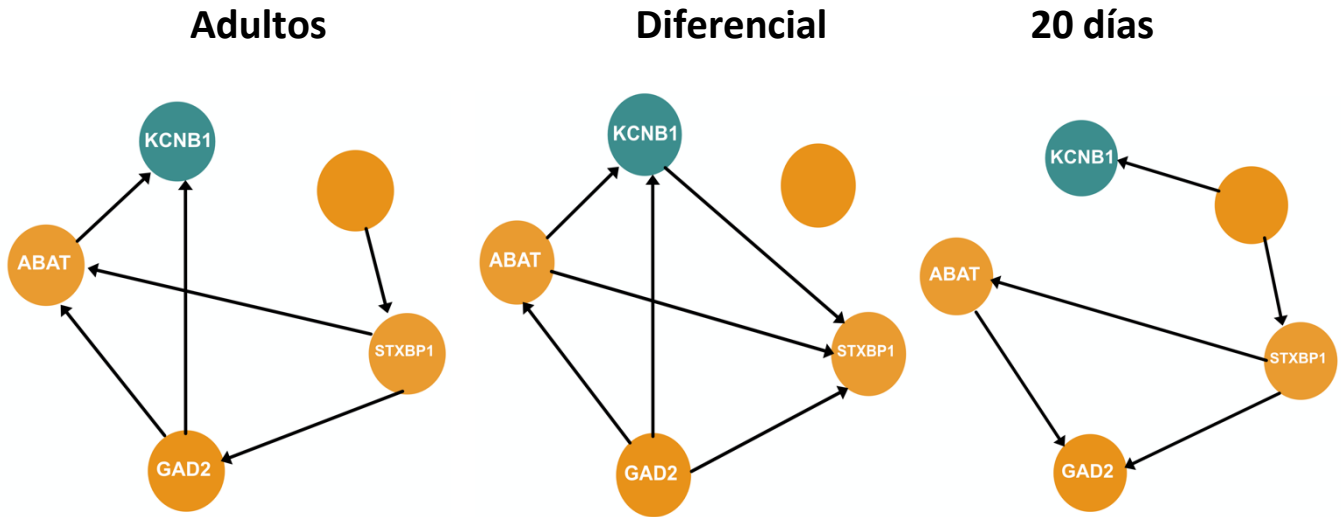
### Exocitosis de insulina



### Guía de los axones de la retina



## Síntesis, degradación y recaptura de GABA

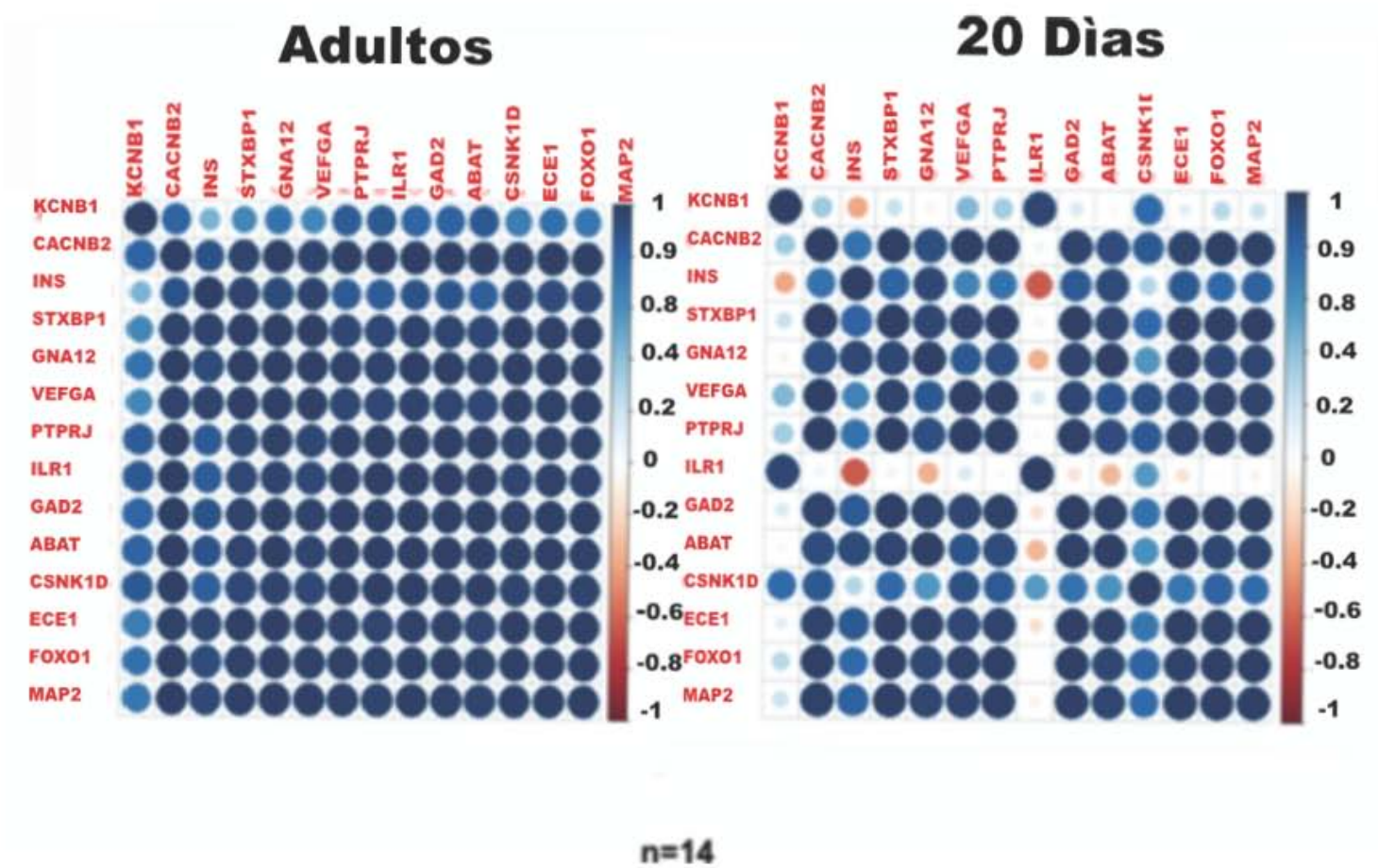


**Figura 14.** Redes bayesianas dirigidas para cada grupo de enriquecimiento funcional y periodo de análisis (20 días o adultos), así como redes diferenciales. (*Kcnb1*).

Set funcional	Base de datos	% Genes	Genes
“Exocitosis de insulina”	“Reactome”	23%	CACNB2, GNAI2, STXBP1
“Guía de los axones retinianos”	”Reactome” “GO_Biological process”	16%	ILR1, PTPRJ, VEFGA
“Síntesis, recaptura y degradación de GABA”	“Reactome”	15%	ABAT, GAD2, STXBP1
“Efectos y metabolismo de la melatonina”	“Reactome” “Wikipathways”	10%	CSNK1D, ECE1, FOXO1, MAP2

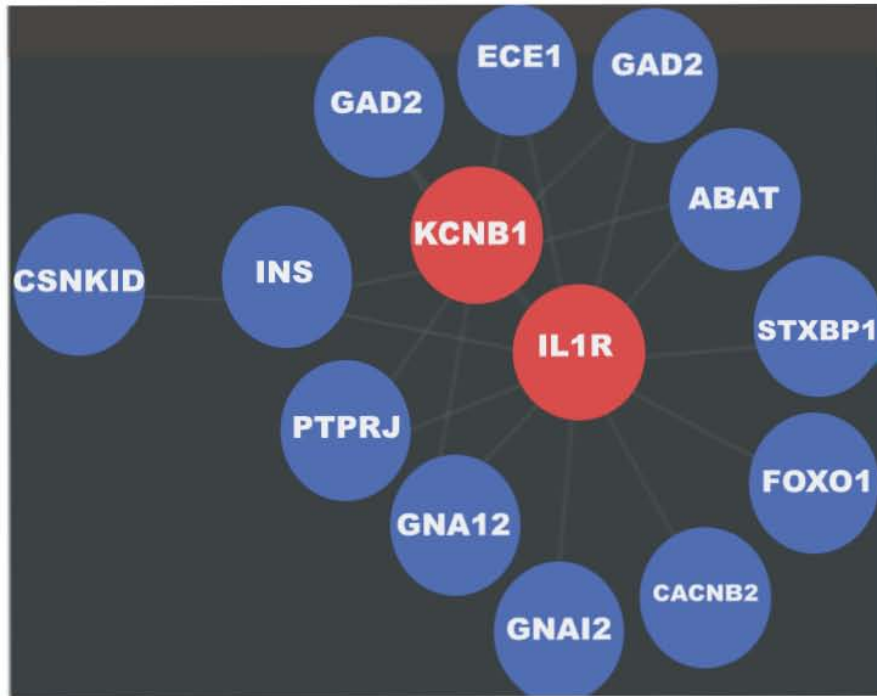
**Tabla 4.** Grupos de enriquecimiento funcional junto con los genes enriquecidos por grupo para *Kcnc1*, los genes marcados con rojo representan genes que regulan de manera directa la expresión de *Kcnc1* tanto de manera positiva como negativa en el transcriptoma, en verde se presenta el factor de transcripción Foxo

a)





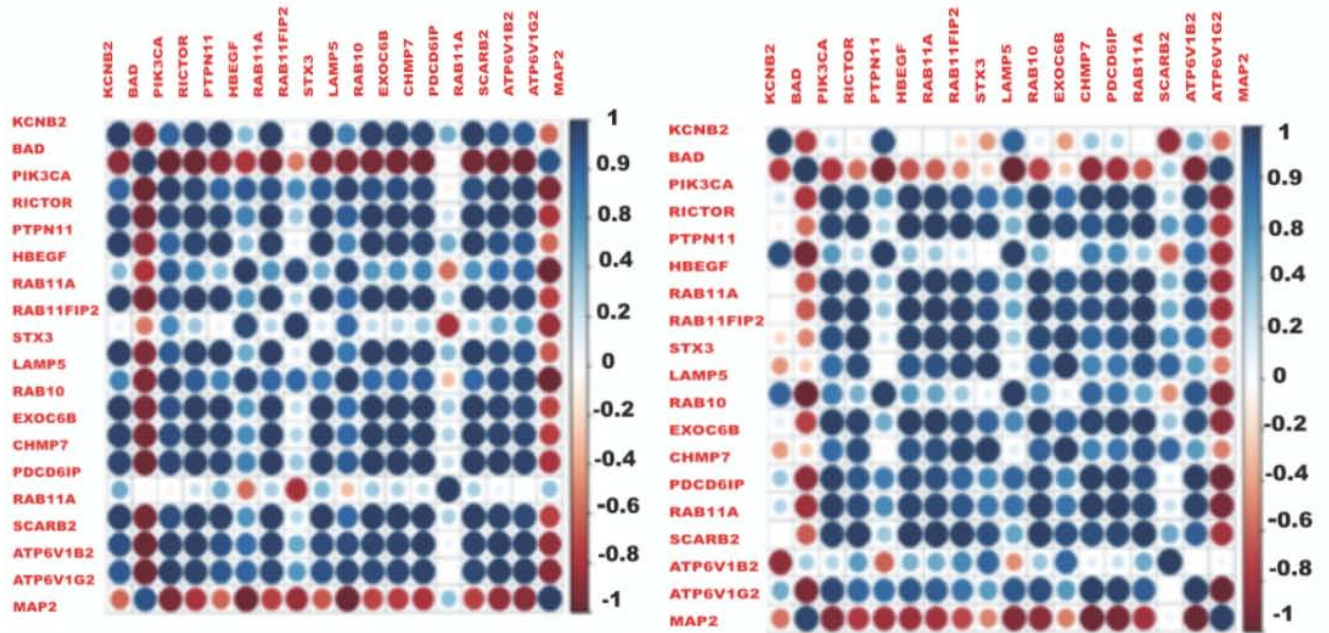
b)



c)

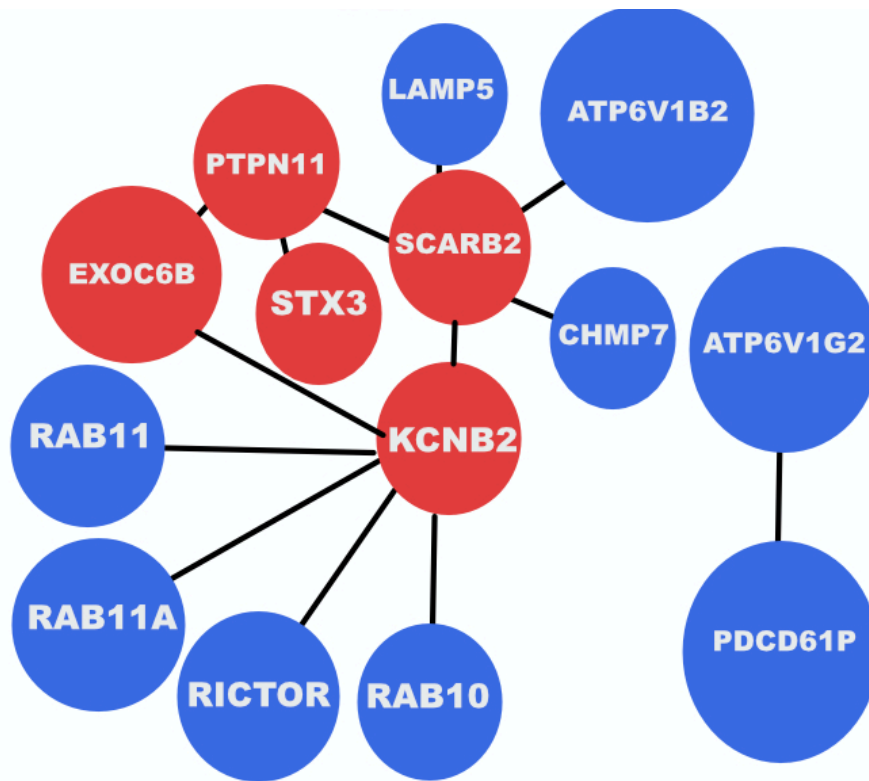
**Adultos**

**20 Dias**



n=18

d)

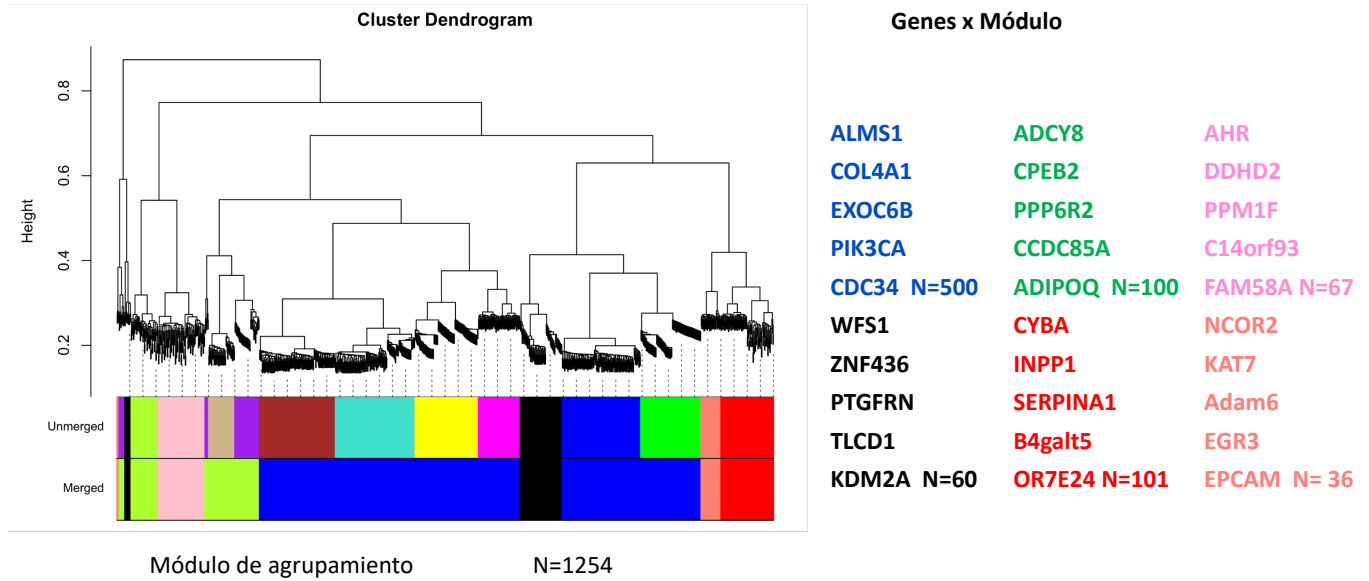


**Figura 15.** a) Mapas de calor con matrices de correlación correspondientes al periodo de 20 días y adultos para *Kcnb1* b) Red de coexpresión diferencial para el gen *Kcnb1* entre periodo de adulto y de 20 días, los genes que ocupan una posición central en la red y se encuentran marcados con rojo (*Kcnb1* e *Ilr1*) representan genes con un alto grado de coexpresión diferencial entre el periodo de adulto y de 20 días c) Mapas de calor con matrices de correlación correspondientes al periodo de 20 días y de adulto para *kcnb2*, d) Red de coexpresión diferencial para el gen *Kcnb2*, los genes que se encuentran al centro de la red y que se encuentran marcados de rojo (*Ptpn11*, *Stx3*, *Exoc6B*, *Kcnb2* y *Scarb2*) representan genes con un alto grado de coexpresión diferencial.

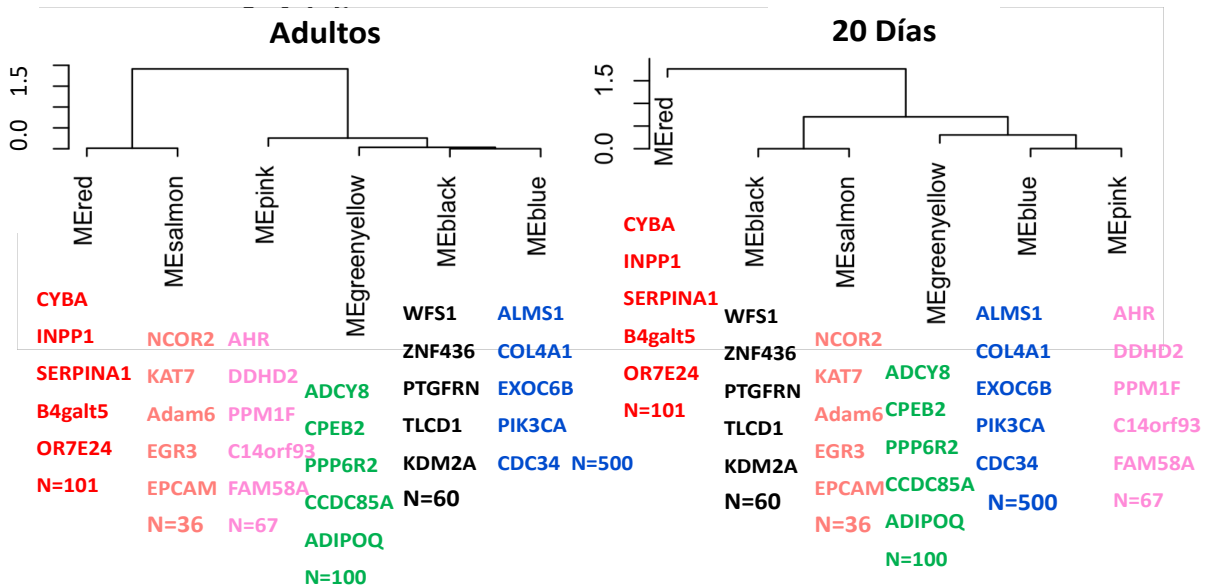
a)

b)

### Agrupamiento de genes con WGCNA (Kcnc2)

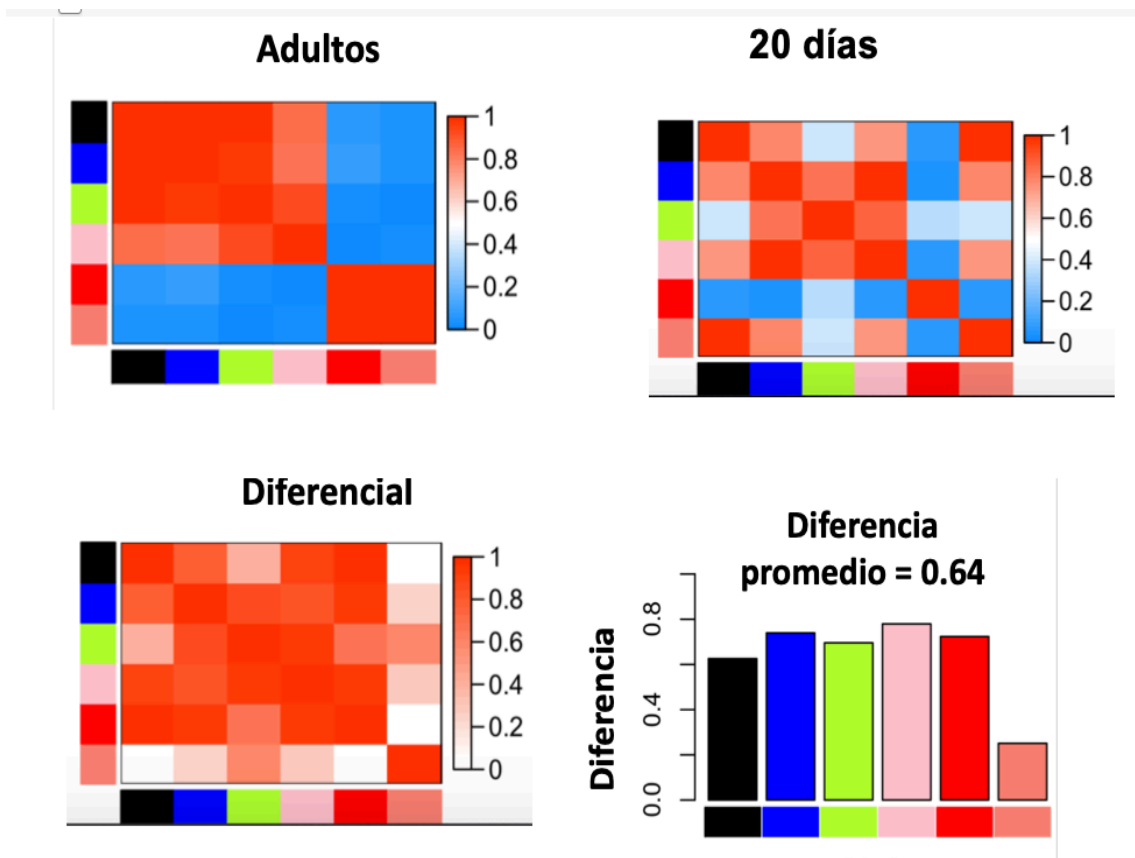


c)



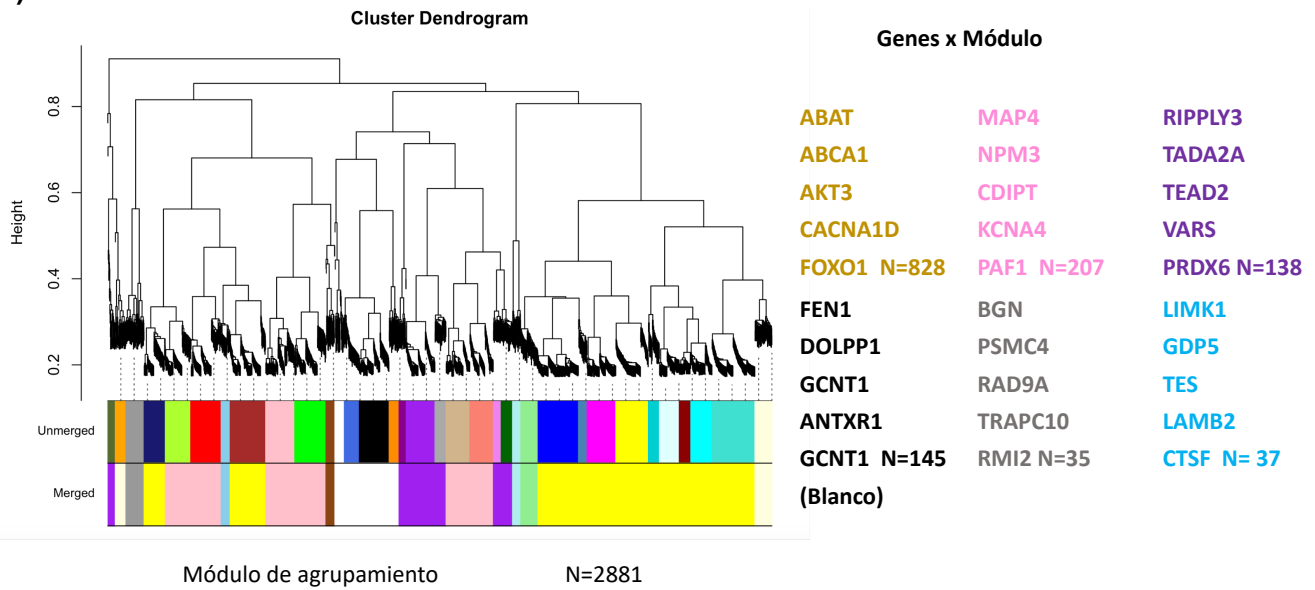


d)

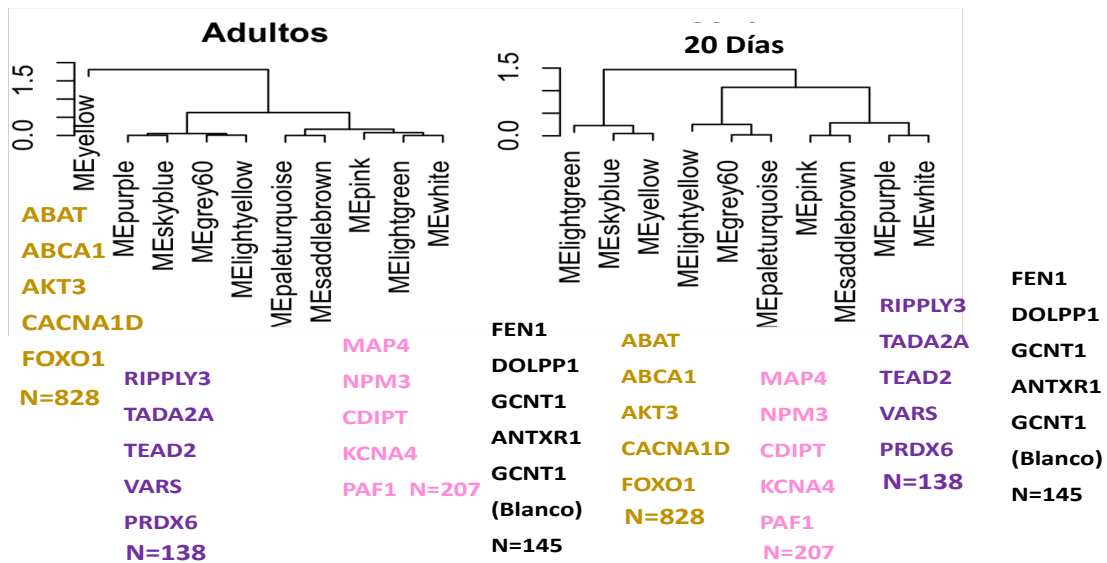


**Figura 16.** a) Dendrograma de agrupación jerárquico con los genes clasificados por módulos y enriquecimiento funcional de los principales genes presentes en cada módulo, en total fueron analizados 1,254 genes que presentaron correlación estadísticamente significativa con la expresión del gen *Kcnc2*. b) Genes enriquecidos por modulo, correlacionados con la expresión del gen *Kcnc2* (se muestran de manera exclusiva los módulos con mayor porcentaje de genes enriquecidos). d) Análisis diferencial de genes coexpresados con el gen *Kcnc2* entre 20 días y adultos, en el que se muestra dendrograma de agrupación jerárquico por módulos para la etapa de 20 días y de adulto, d) mapas de calor representativos, mostrando los niveles de correlación génica al periodo de 20 días y de adulto, así como mapa de coexpresión diferencial entra ambas etapas

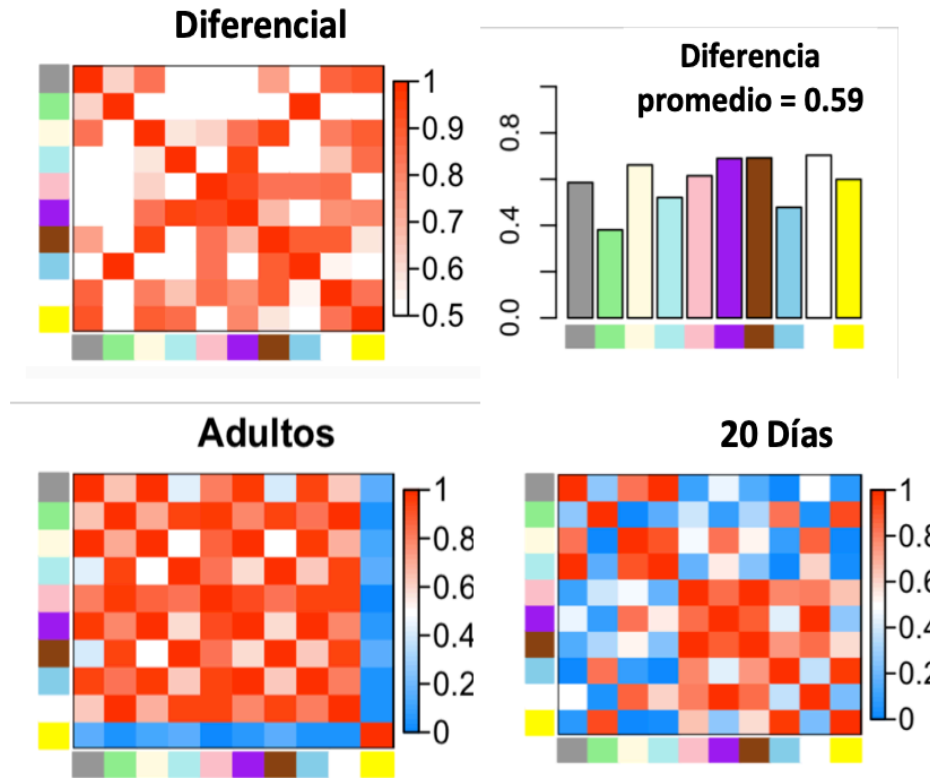
a)



b)



c)



**Figura 17.** a) Dendrograma de agrupación jerárquico con los genes clasificados por módulos y enriquecimiento funcional de los principales genes presentes en cada módulo, en total fueron analizados 2,881 genes que presentaron correlación estadísticamente significativa con la expresión del gen *Kcnb1*. b) Genes enriquecidos por modulo, correlacionados con la expresión del gen *Kcnb1* (se muestran de manera exclusiva los módulos con mayor porcentaje de genes enriquecidos). c) Análisis diferencial de genes coexpresados con el gen *Kcnb1* entre el periodo de 20 días y adultos, en el que se muestra dendrograma de agrupación jerárquico por módulos para la etapa de 20 días y de adulto. d) Mapas de calor representativos, mostrando los niveles de correlación génica al periodo de 20 días y de adulto, así como mapa de coexpresión diferencial entra ambas etapas.

## Discusión

El análisis de redes de coexpresión y la construcción de las redes bayesianas regulatorias con enriquecimiento funcional, así como el agrupamiento jerárquico por módulos de redes pesadas (“Weighted”), muestran la gran variedad de genes junto con sus grupos de enriquecimiento que llevan a cabo la regulación de la expresión de ambos genes de interés (*Kcnc1* y *Kcnc2*).

### 1. Los canales Kv2.1 y su regulación transcripcional

Greitzer y colaboradores describieron que los canales Kv2.1 interactúan de manera directa, a través de la porción carboxilo terminal de sus subunidades  $\alpha$  con proteínas de la familia SNARE (sintaxina 1A y sintaxina 3), mismas que participan en el acoplamiento de las vesículas secretoras con la membrana plasmática de las células  $\beta$  (Greitzer-Antes et al., 2018). Cabe destacar que la sintaxina 1A participa en el anclaje de las vesículas secretoras previamente acopladas con la membrana plasmática (responsables de la primera fase de secreción de insulina), mientras que la sintaxina 3 permite el anclaje de las vesículas secretoras recién llegadas a la membrana plasmática y que no se encuentran previamente acopladas con la membrana (responsables de la segunda fase de secreción de insulina) (Greitzer-Antes et al., 2018). Es notable que los canales Kv2.1 forman clústers en la superficie membranal, los cuales favorecen el acoplamiento de nuevas vesículas a través de su interacción con la sintaxina 3 durante la segunda fase de secreción de insulina, conformando sitios funcionales o estaciones de acoplamiento membranal. Tales estaciones se encuentran compuestas por agrupaciones de canales Kv2.1 junto con proteínas SNARE, incluyendo a la sintaxina 1 A y a la sintaxina 3, así como a las proteínas Vamp (*VapA* y *VapB*) (Greitzer-Antes et al., 2018).

De acuerdo con los resultados obtenidos a través del análisis de redes bayesianas, genes que codifican para proteínas de la maquinaria secretora de las células  $\beta$ , así como moléculas que participan en la cascada de señalización de insulina, presentaron un alto grado de correlación mutua, siendo por lo tanto agrupadas en módulos a través de la construcción de dendrogramas de agrupamiento jerárquico para ambos genes en estudio (*Kcnb1* y *Kcnb2*). Dentro de los genes agrupados en los módulos destacan *Foxo1* y *Abat*, así como *Exoc6b* y *Pik3ca* correlacionados con los genes *Kcnb1* y *Kcnb2* respectivamente.

De manera particular, dentro del grupo de enriquecimiento “Exocitosis de insulina”, el gen *Stxbp1*, mismo que codifica para una proteína de unión a la sintaxina 1, 2 y 3 muestra una probable regulación de la expresión de *Kcnb1* a nivel transcripcional de acuerdo con las redes bayesianas construidas. Lo anterior sugiere que la interacción entre los canales Kv2.1 (*Kcnb1*) y las proteínas de acoplamiento de vesículas secretoras se lleva a cabo también a nivel del transcriptoma, encontrando adicionalmente, a través del análisis de enriquecimiento funcional de genes correlacionados con la expresión de *Kcnb1*, genes tales como *Syn1* (“ciclo de liberación de neurotransmisores”), miembro de la familia de las sinapsinas, mismas que son fosfoproteínas ancladas a las vesículas secretoras y que median su acoplamiento con la membrana plasmática.

Genes adicionales enriquecidos, asociados con la expresión de *Kcnb1* incluyeron a *Syt4*, que participa en el acoplamiento vesicular mediado por calcio, así como la formación de nuevas sinapsis, *Ptprn*, que es requerido para la acumulación de vesículas secretoras en el hipocampo e islotes pancreáticos, *Erc2*, que participa en la regulación de la exocitosis de neurotransmisores, así como *Cadps*, asociado con el proceso de preparación (“priming”) mediante el cual las vesículas adquieren su capacidad de ser secretadas.

En modelos mutantes de roedor de canales de potasio como el KATP (*Abcc8<sup>-/-</sup>*), se ha observado, que un conjunto de genes regulados por calcio es expresado al alta incluyendo factores de transcripción tales como *Nfatc1*, *Mef2c* y *Mef2d*, además de cinasas relacionadas con la señalización mediada por  $Ca^{2+}$  incluyendo *CamK1d*, *Camkk1* y *Camkk2*, junto con 5 proteínas de unión a calcio que incluyen *S100a1*, *S100a3*, *S100a4*, *S100a6* y *S100a13* (Stancill *et al.*, 2017). Cabe destacar que dentro de los grupos de genes correlacionados con la expresión de *Kcnc1*, destaca el grupo de enriquecimiento funcional (“Regulación de la exocitosis mediada por calcio”), que incluye a *Stxbp1*, *Syn1* y *Syt4*, lo que sugiere que la expresión de canales Kv2 se asocia con la transcripción de genes relacionados con la respuesta a un aumento en la concentración de calcio intracelular, incluyendo aquellos relacionados con el proceso de exocitosis.

Cabe destacar que al comparar la correlación entre los genes reguladores del canal Kv2.1 en la etapa de 20 días con respecto a la etapa de adulto, se observó mayor correlación mutua en la etapa de adulto con respecto a la etapa de 20 días, así como un cambio en la conectividad de la red correspondiente para cada edad (los nodos exhibieron mayor grado y coeficiente de agrupación en la etapa de adulto con respecto a la etapa de 20 días), lo que sugiere mayor robustez en la regulación transcripcional en la etapa de adulto con respecto a la etapa de 20 días.

## **2. Los canales Kv2.2 y su regulación transcripcional**

Con respecto a los genes que presentaron correlación con la expresión de *Kcnc2*, de manera análoga, se encontró enriquecimiento en grupos funcionales tales como “Anclaje vesicular en exocitosis” y “Organización de los endosomas”. Dentro de los genes enriquecidos en los grupos funcionales mencionados anteriormente destacan *Exo6B* (componente 6B del exosoma), *Rab10* (ATPasa reguladora del flujo de vesículas), *Lamp5* (familia de proteínas lisosomales asociadas con la membrana), *Stx3* (sintaxina 3), *Rab11a* (ATPasa reguladora del flujo de vesículas) y *Chmp7* (Proteína que participa en el acoplamiento de partículas virales con la membrana).

Dentro de los genes reguladores de la expresión del gen *Kcnb2* (Kv2.2) destacan aquellos que participan en procesos tales como división celular (*Alms1* y *Anapc1*) y genes que participan en el desarrollo del páncreas (*Gnai2*, *Rfx8* y *Wfs1*), lo que sugiere que la expresión del canal Kv2.2 pudiera regular la división celular en las células  $\beta$  durante el periodo del desarrollo postnatal del páncreas. Se ha reportado que los canales Kv2 regulan procesos tales como la división celular en líneas celulares tumorales de linfoma y que el bloqueo de la actividad de dichos canales, utilizando 4-AP (inhibidor inespecífico de canales de  $K^+$  (Kca, KATP y Kv) inhibe la actividad proliferativa de una línea celular de cáncer de ovario humano (Ru *et al.*, 2014).

Lo anterior sugiere que, a pesar que de acuerdo con la evidencia actual los canales Kv2.2 no parecen formar agrupaciones en la superficie membranal ni tampoco haber interacciones descritas entre dichos canales y los componentes de la maquinaria secretoria de vesículas de insulina (Jianyang *et al.*, 2017; Greitzer-Antes *et al.*, 2018), el presente análisis sugiere que *Kcnb2* también juega un papel regulador de la expresión de genes que participan en el mecanismo de acoplamiento y fusión de las vesículas secretoras a nivel transcripcional, asociados con el proceso de secreción de insulina, a través del transporte, direccionamiento, anclaje y fusión de las vesículas secretoras tanto a los 20 días como en la etapa de adulto.

Adicionalmente se encontró un set de genes clasificado dentro del grupo “unión proteica dependiente de calcio”, mismo que incluye a los genes (*Myo1D*, *Nrxn1*, *Syn1* y *Wfs1j*). Es destacable que genes capaces de regular la expresión de diversos canales catiónicos como los Kv2 participan en el metabolismo y transporte del calcio intracelular, así como el acoplamiento de vesículas intracelulares con la membrana plasmática a través de un mecanismo mediado por calcio.

De manera análoga a lo observado para los genes reguladores del canal Kv2.1, los genes reguladores para Kv2.2 mostraron mayor agrupación y conectividad dentro de la red correspondiente para la etapa de adulto con respecto a la etapa de 20 días.

### 3. Genes reguladores de la expresión de los canales Kv2 y su participación en la maduración funcional

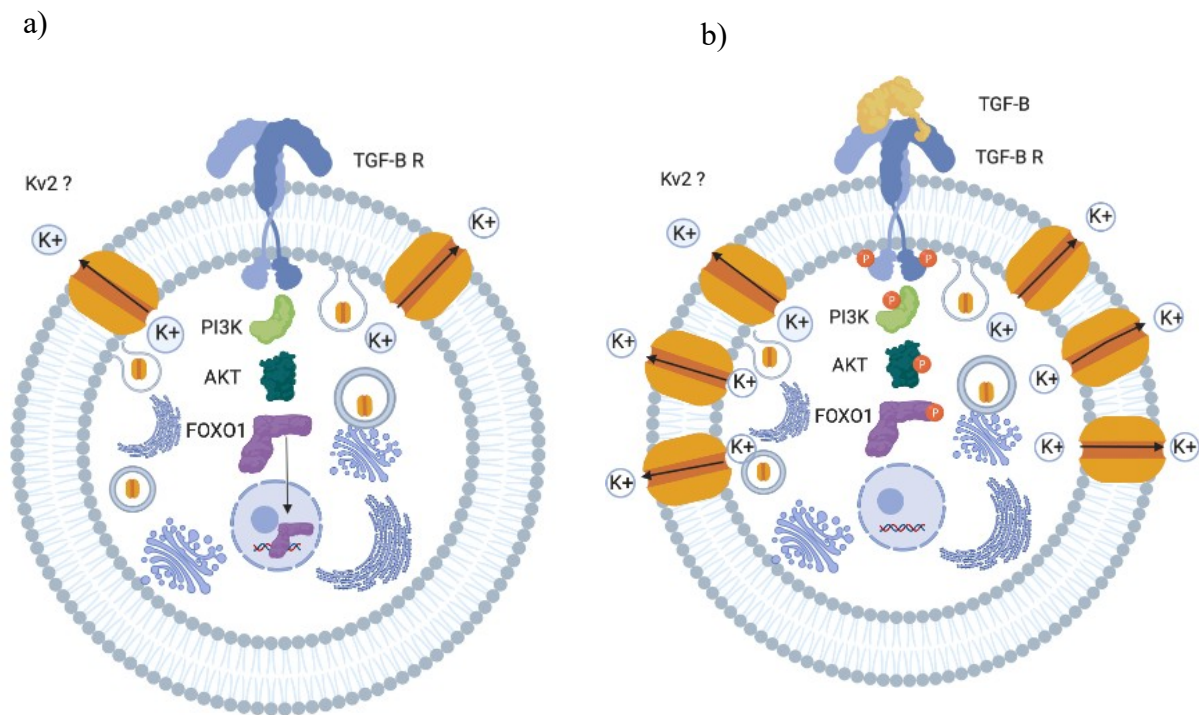
En el contexto de la maduración funcional de la célula  $\beta$ , el aumento en la correlación entre los genes estudiados durante la fase de adulto, así como la participación de genes incluidos en grupos de enriquecimiento funcional diversos, tales como señalización por PI3K y acoplamiento de vesículas secretoras con la membrana plasmática sugiere que tales genes y su patrón de expresión contribuyen al desarrollo del fenotipo de la célula  $\beta$  madura, incluyendo su respuesta a un cambio en la concentración extracelular de glucosa mediante la secreción bifásica de insulina. Al realizar análisis de coexpresión diferencial pesado para las 2 etapas, genes como *Exo6b* y PI3K presentaron mayor diferencia promedio en su relación, lo cual sugiere que en las células  $\beta$  de los adultos la secreción de insulina es un proceso estrechamente modulado, a diferencia de lo que ocurre en la etapa de 20 días.

Se sabe que las células  $\beta$  inmaduras tienen menor sensibilidad a cambios en la concentración extracelular de glucosa y que dicha sensibilidad se encuentra mediada por la acción de la insulina sobre las células  $\beta$  (Leibiger, Leibiger y Berggren, 2008). A través del análisis de redes de coexpresión pesadas se encontró que tanto el gen PI3K como *Foxo1* (siendo ambos genes clave en la cascada de señalización de la insulina), presentaron un patrón diferencial de correlación, mostrando menor correlación en el periodo de 20 días con respecto al del adulto. Lo anterior sugiere que la menor sensibilidad a cambios en la concentración extracelular de glucosa, observada en células de 20 días se correlaciona con menor regulación de la expresión de genes que participan en la cascada de señalización de insulina, así como de los canales Kv2.



#### 4. La cascada de señalización de TGF- $\beta$ y su participación en la regulación transcripcional de los canales Kv2

En células de miocardio, es notable que moléculas clave en la cascada de señalización de TGF- $\beta$ , tales como *Foxo1* y PI3K juegan un papel regulador a nivel transcripcional de la expresión del canal Kv2.1 (*Kcnc1*) y que de acuerdo a lo reportado por Kaur y colaboradores TGF- $\beta$  tiene la capacidad de regular la expresión de canales de sodio sensibles a voltaje (Nav) a través de una vía dependiente de PI3K y AKT en miocardiocitos (Kaur *et al.*, 2013). Los resultados del presente análisis sugieren que tanto PI3K como Foxo1 pueden regular la expresión de los canales Kv2 tanto en periodo de 20 días como en el periodo de adulto, proponiendo que ante la activación de la cascada de señalización de PI3K-AKT por TGF- $\beta$  se activa la expresión de ambos canales estudiados en la célula  $\beta$  (Figura 18)



**Figura 18.** Modelo propuesto para la acción de TGF  $\beta$  en la regulación de la expresión de los canales Kv2 en la célula  $\beta$ , a) se propone que al no haber activación del receptor de TGF  $\beta$ , *Foxo1* se encuentra en su forma no fosforilada, reprimiendo la expresión de los canales Nav1.5 y Kv2, b) cuando se activa la cascada de señalización, *Foxo1* es fosforilado por Akt, permaneciendo en el citoplasma, lo cual libera la expresión de los canales Kv2.

### **5. Aporte del trabajo y sus limitaciones**

Los resultados aquí presentados constituyen un buen abordaje inicial que permite entender y caracterizar la forma en la que la expresión de los canales Kv2.1 y Kv2.2 es regulada a nivel transcripcional, junto con los genes y procesos fisiológicos que forman parte de dicho proceso. Es notable destacar que el análisis del transcriptoma es limitado, pues no toma en consideración los múltiples y complejos mecanismos regulatorios que se dan a través de interacciones proteína-proteína o bien por modificaciones post-traduccionales entre las moléculas aquí descritas. De igual manera la cantidad baja de repeticiones por condición (20 días y adultos) (n=3) limita la capacidad predictiva de modelos como el de red bayesiana, debido a ser métodos cuya sensibilidad y especificidad mejoran en función del tamaño de la muestra. Los estudios de microarreglo, por su naturaleza y complejidad técnica suelen tener un número limitado de repeticiones, por lo que es conveniente validar los resultados obtenidos a través de análisis por modelos estadísticos como las redes de coexpresión o las redes bayesianas de forma experimental.

El presente trabajo propone, desde el punto de vista de los mecanismos de regulación transcripcional, una posible explicación a las características fenotípicas de las células  $\beta$  inmaduras (con poca capacidad para discriminar cambios en la concentración extracelular de glucosa y secreción monofásica de insulina), lo cual se refleja por menor grado de interacción entre los genes que regulan la expresión de ambos canales Kv2, siendo estos genes participes en procesos como el acoplamiento de vesículas de insulina y la cascada de señalización de insulina.

## Conclusiones

- 1) La expresión del canal **Kv2.1** es regulada por un grupo heterogéneo de genes que incluyen a **Foxo1**, **Stxbp1** e **Ilr-1**, mismos que participan en procesos como señalización de insulina, acoplamiento vesicular e inflamación.
- 2) La expresión del canal **Kv2.2** es regulada por un grupo heterogéneo de genes que incluyen a **PI3K**, **Lamp5** y **Rab11a**, los cuales participan en procesos como señalización de insulina y acoplamiento vesicular.
- 3) El gen **Kcnb1** es regulado por el factor de transcripción **Foxo1**, mientras que el gen **Kcnb2** es regulado por **PI3K**. Tanto **PI3K** como **Foxo1** participan en las cascadas de señalización de insulina y TGF $\beta$ 1.
- 4) Los genes regulatorios de ambos canales mostraron mayor correlación en la etapa de adulto con respecto a la etapa de 20 días.

## Referencias

- 1 Aguayo-Mazzucato, C. *et al.* (2006) 'Restructuring of pancreatic islets and insulin secretion in a postnatal critical window', *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0000035.
- 2 Al-Achi, A. (2019) 'The Student's t-Test: A Brief Description', 5, pp. 1–3.
- 3 Aye, T. *et al.* (2010) 'Identification of markers for newly formed  $\beta$ -cells in the perinatal period: A time of recognized  $\beta$ -cell immaturity', *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. doi: 10.1369/jhc.2009.954909.
- 4 Bader, G. D. and Hogue, C. W. V. (2003) 'An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks', *BMC Bioinformatics*. doi: 10.1186/1471-2105-4-2.
- 5 Biddinger, S. B. and Kahn, C. R. (2006) 'FROM MICE TO MEN: Insights into the Insulin Resistance Syndromes', *Annual Review of Physiology*. doi: 10.1146/annurev.physiol.68.040104.124723.
- 6 Bonner-Weir, S., Aguayo-Mazzucato, C. and Weir, G. C. (2016) 'Dynamic development of the pancreas from birth to adulthood', *Upsala Journal of Medical Sciences*. doi: 10.3109/03009734.2016.1154906.
- 7 Bøttcher, S. G. and Dethlefsen, C. (2003) 'Deal: A package for learning bayesian networks', *Journal of Statistical Software*. doi: 10.18637/jss.v008.i20.
- 8 Broido, A. D. and Clauset, A. (2019) 'Scale-free networks are rare', *Nature Communications*, 10(1), p. 1017. doi: 10.1038/s41467-019-08746-5.
- 9 Cabrera-Vásquez, S. *et al.* (2009) 'Remodelling sympathetic innervation in rat pancreatic islets ontogeny', *BMC Developmental Biology*. doi: 10.1186/1471-213X-9-34.
- 10 Caffrey, J., Brown, A. and Schneider, M. (2018) 'Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup> currents in developing skeletal myoblasts are expressed in a sequential program: reversible suppression by transforming growth factor beta-1, an inhibitor of the myogenic pathway', *The Journal of Neuroscience*. doi: 10.1523/jneurosci.09-10-03443.1989.
- 11 Correa-Medina, M. *et al.* (2009) 'MicroRNA miR-7 is preferentially expressed in endocrine cells of the developing and adult human pancreas', *Gene Expression Patterns*. doi: 10.1016/j.gep.2008.12.003.

- 12 Fu, J. *et al.* (2017) 'Kv2.1 clustering contributes to insulin exocytosis and rescues human  $\beta$ -cell dysfunction', in *Diabetes*. doi: 10.2337/db16-1170.
- 13 Gandasi, N. R. *et al.* (2018) 'Glucose-Dependent Granule Docking Limits Insulin Secretion and Is Decreased in Human Type 2 Diabetes', *Cell Metabolism*. doi: 10.1016/j.cmet.2017.12.017.
- 14 Gerber, S. H. and Südhof, T. C. (2002) 'Molecular determinants of regulated exocytosis', in *Diabetes*.
- 15 Goodyer, W. R. *et al.* (2012) 'Neonatal  $\beta$  Cell Development in Mice and Humans Is Regulated by Calcineurin/NFAT', *Developmental Cell*. doi: 10.1016/j.devcel.2012.05.014.
- 16 Gravagna, N. G. and Ribera, A. B. (2010) 'Potassium Channel Regulation', in *Encyclopedia of Neuroscience*. doi: 10.1016/B978-008045046-9.01639-9.
- 17 Hiriart, M. *et al.* (2014) 'Metabolic syndrome and ionic channels in pancreatic beta cells', in *Vitamins and Hormones*. doi: 10.1016/B978-0-12-800174-5.00004-1.
- 18 J., S. and M., S. (2010) 'The insulin secretory granule as a signaling hub', *Trends in Endocrinology and Metabolism*. doi: 10.1016/j.tem.2010.06.003.
- 19 Jacovetti, C. *et al.* (2015) 'Postnatal  $\beta$ -cell maturation is associated with islet-specific microRNA changes induced by nutrient shifts at weaning', *Nature Communications*. doi: 10.1038/ncomms9084.
- 20 Karpurapu, M. *et al.* (2008) 'NFATc1 targets cyclin A in the regulation of vascular smooth muscle cell multiplication during restenosis', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.M800423200.
- 21 Kaur, K. *et al.* (2013) 'TGF- $\beta$ 1, Released by Myofibroblasts, Differentially Regulates Transcription and Function of Sodium and Potassium Channels in Adult Rat Ventricular Myocytes', *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0055391.
- 22 Keane, K. and Newsholme, P. (2014) 'Metabolic regulation of insulin secretion', in *Vitamins and Hormones*. doi: 10.1016/B978-0-12-800174-5.00001-6.

- 23 Larqué, C. *et al.* (2016) 'Transcriptome landmarks of the functional maturity of rat beta-cells, from lactation to adulthood', *Journal of Molecular Endocrinology*. doi: 10.1530/jme-16-0052.
- 24 Lee, J. C. *et al.* (2001) 'Regulation of the pancreatic pro-endocrine gene 25 neurogenin3', *Diabetes*. doi: 10.2337/diabetes.50.5.928.
- 25 Leibiger, I. B., Leibiger, B. and Berggren, P.-O. (2008) 'Insulin Signaling in the Pancreatic  $\beta$ -Cell', *Annual Review of Nutrition*. doi: 10.1146/annurev.nutr.28.061807.155530.
- 26 Navarro-Tableros, V. *et al.* (2007) 'Physiological development of insulin secretion, calcium channels, and GLUT2 expression of pancreatic rat  $\beta$ -cells', *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. doi: 10.1152/ajpendo.00457.2006.
- 27 Nieto, M. *et al.* (2012) 'Antisense miR-7 impairs insulin expression in developing pancreas and in cultured pancreatic buds', *Cell Transplantation*. doi: 10.3727/096368911X612521.
- 28 Olbrot, M. *et al.* (2002) 'Identification of  $\beta$ -cell-specific insulin gene transcription factor RIPE3b1 as mammalian MafA', *Proceedings of the National Academy of Sciences*. doi: 10.1073/pnas.102168499.
- 29 Oliver-Krasinski, J. M. and Stoffers, D. A. (2008) 'On the origin of the beta cell', *Genes Dev*. doi: 22/15/1998 [pii]r10.1101/gad.1670808.
- 30 Ramos-Mondragón, R., Vega, A. V. and Avila, G. (2011) 'Long-term modulation of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> channels by TGF- $\beta$ 1 in neonatal rat cardiac myocytes', *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*. doi: 10.1007/s00424-010-0912-3.
- 31 Ro der, P. V. *et al.* (2016) 'Molecular regulation of insulin granule biogenesis and exocytosis', *Biochemical Journal*. doi: 10.1042/bcj20160291.
- 32 Rovira, M. and Ferrer, J. (2015) 'Weaning Gives  $\beta$  Cells License to Regenerate', *Developmental Cell*. doi: 10.1016/j.devcel.2015.02.016.
- 33 Ru, Q. *et al.* (2014) 'Voltage-gated and ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels are associated with cell proliferation and tumorigenesis of human glioma', *Oncology Reports*. doi: 10.3892/or.2013.2875.

- 34 Shirakawa, J. and Kulkarni, R. N. (2016) 'ERRγ - A New Player in β Cell Maturation', *Cell Metabolism*. doi: 10.1016/j.cmet.2016.04.026.
- 35 Song, L., Langfelder, P. and Horvath, S. (2012) 'Comparison of co-expression measures: mutual information, correlation, and model based indices', *BMC Bioinformatics*, 13(1), p. 328. doi: 10.1186/1471-2105-13-328.
- 36 Suckale, J. and Solimena, M. (2010) 'The insulin secretory granule as a signaling hub', *Trends in Endocrinology and Metabolism*. doi: 10.1016/j.tem.2010.06.003.
- 37 Taniguchi, C. M. *et al.* (2006) 'Divergent regulation of hepatic glucose and lipid metabolism by phosphoinositide 3-kinase via Akt and PKC $\alpha/\zeta$ ', *Cell Metabolism*. doi: 10.1016/j.cmet.2006.04.005.
- 38 Uchida, K. and Tominaga, M. (2011) 'TRPM2 modulates insulin secretion in pancreatic β-cells', *Islets*. doi: 10.4161/isl.3.4.16130.
- 39 V., M. (2016) 'Anatomy of the pancreas and spleen', *Surgery (United Kingdom)*. doi: 10.1016/j.mpsur.2016.03.014.
- 40 Yoshihara, E. *et al.* (2016) 'ERRγ Is Required for the Metabolic Maturation of Therapeutically Functional Glucose-Responsive β Cells', *Cell Metabolism*. doi: 10.1016/j.cmet.2016.03.005.
- 41 Zhang, Y. *et al.* (2015) 'PI3K is involved in P2Y receptor-regulated cAMP /Epac/Kv channel signaling pathway in pancreatic β cells', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.08.057.







