Índice

[**Introducción**](#_q6fokuk6z3zt) **1**

[Información previa.](#_mi2buyj1cgt6) 1

[**Objetivos**](#_cfi7wc7qtr4x) **1**

[**Materiales y métodos**](#_s040bcwlh8ts) **2**

[Naturaleza de los datos](#_2vktb7xj153b) 2

[Diseño experimental](#_svctruk5tcmz) 2

[Métodos utilizados en el análisis](#_xoculsl0yc82) 3

[Análisis qPCR](#_fbxdu7lditbp) 3

[Análisis de inmunofluorescencia](#_pv0guw9s1co3) 3

[Tipos de microarrays utilizados](#_hvajebmmaaat) 4

[**Análisis de datos con R**](#_sx1z794rh26r) **5**

[**Bibliografía**](#_vuy0yzhb6z33) **7**

# 

# Introducción

Este documento pretende explicar el estudio sobre la expansión in vitro de **células beta** (β): mostrar qué mueve a realizar este estudio, cuál es la hipótesis planteada en un principio, qué métodos biotecnológicos y estadísticos se han utilizado y cuáles han sido los resultados finales.

### Información previa.

El **páncreas** es un órgano que, entre muchas otras cosas, está formado por islotes de Langerhans. Los islotes pancreáticos son cúmulos de células, la mayoría de las cuales son células beta que producen la hormona de la **insulina**, secretada para regular la glucemia en sangre. La enfermedad de la **diabetes** se caracteriza por la destrucción de células beta y, por lo tanto, en un defecto en la regulación de la glucemia que causa insulinodependencia. Las donaciones de páncreas son escasas por lo que el trasplante de islotes de células beta se ve limitado.

De aquí nace el deseo de estudiar cómo expandir las células beta obtenidas a partir de islotes de páncreas cadavéricos. No obstante, las células beta tienen una capacidad de proliferación baja in vivo y los intentos de inducir la expansión de las células beta cultivadas in vitro siempre han dado como resultado la **desdiferenciación** celular: pérdida del fenotipo de las células beta y consecuentemente, su funcionalidad biológica (producir insulina).

# Objetivos

Los investigadores han demostrado mediante el rastreo de **linaje celular[[1]](#footnote-0)** la existencia de células beta-derivadas supervivientes de la desdiferenciación y la replicación de estas. También, **análisis epigenéticos[[2]](#footnote-1)** de las células beta-derivadas han indicado que los genes se han mantenido a pesar de no haberse transcrito.

Se hipotetiza, pues, que la célula desdiferenciada ha mantenido su epigenoma y que, por lo tanto, es el epigenoma el responsable de que la célula pueda seguir produciendo insulina. Esto significa que, si se consigue rediferenciar las células beta-derivadas, es decir, si se logra que vuelvan a producir insulina (recuperación del fenotipo) la expansión de células beta-derivadas podría generar suficientes células como para reponer las células beta humanas.

# Materiales y métodos

### Naturaleza de los datos

Los islotes de los donantes se disociaron en células individuales, y las células beta se marcaron, se expandieron y cultivaron. Algunas células se mantuvieron en un medio sin sérum (**SFM**) mientras que otras fueron tratadas con un cóctel de rediferenciación (**RC**).

Además,para el caso de las células no tratadas, se aprovechó la capacidad de los **virus** para introducirse en células e incorporar su propio material genético al genoma del organismo infectado. Se utilizó un lentivirus (virus de infección lenta) al que se le introdujo un **plásmido[[3]](#footnote-2)** con un gen particular expresamente para inhibir el gen SLUG de las células beta. Este gen codifica una proteína que reprime la transcripción de ciertas secuencias que hacen que la célula se desdiferencie.

De esta manera, a partir de las células expandidas de los islotes donados, se obtuvieron células re-diferenciadas (RC) y células no diferenciadas (medio SFM infectadas con el virus).

### 

### Diseño experimental

Objetivo: determinar si las células de islotes expandidas y re-diferenciadas consiguen más células beta que segreguen insulina.

Variable respuesta: intensidad del color para medir la expresión génica.

Factor: medio en el que se encuentran las células.

El individuo objeto de estudio son las células beta obtenidas a partir de islotes de páncreas cadavéricos.

En el apartado anterior se han mencionado dos condiciones que se aplicaron a las células cultivadas, pero se experimentó también con células que no fueron cultivadas ni expandidas, o sea que fueron estudiadas tan pronto como fueron obtenidas.

Así pues, la expresión génica fue estudiada en estos 3 grupos:

* Células de islotes no expandidas (4 donantes).
* Células de islotes expandidas y no diferenciadas (4 donantes).
* Células de islotes expandidas y re-diferenciadas (3 donantes).

Lo que significa que se tuvo un diseño ANOVA de 1 factor a 3 niveles; y se utilizó un total de 11 microarrays (1 para cada donante).

### Métodos utilizados en el análisis

##### Análisis qPCR

El análisis qPCR es un método que permite la amplificación específica del ADN y la cuantificación de la expresión génica de una muestra en tiempo real. Este análisis se realiza con un termociclador[[4]](#footnote-3) y un espectrofluorímetro[[5]](#footnote-4), este último se encarga de definir la fluorescencia producida en el tubo de amplificación en todo momento, con el fin de combinar la amplificación del DNA con su detección. La presencia del fluoróforo es persistente en la reacción y la señal obtenida al final de cada ciclo de amplificación es representada en una gráfica frente al número de ciclos, por lo tanto al final se obtiene una curva que representa el intervalo del proceso.

Se suele basar en la comparación entre un tratamiento y un control a partir de tests que asumen normalidad.

Para cuantificar los datos, se suele relacionar la señal obtenida con el contenido de ADN, para ello se utiliza la curva de calibrado, esto se hace cuando todos tienen una misma eficiencia de amplificación. Otra manera de cuantificar los datos es expresar el cambio en los niveles de expresión de ARNm .

Los valores de fluorescencia se expresan como logaritmos para así estudiar la fase exponencial de amplificación.

*¿Para qué se usa el qPCR?*

El qPCR se usa, para la investigación y el diagnóstico como método para cuantificar la cantidad ácido nucleico. Los resultados se basan en la expresión del gen candidato frente a una referencia o una cuantificación absoluta basada en curvas de calibración[[6]](#footnote-5) externas o internas.

Para su análisi se hacen ratios entre la señal de un tratamiento y la de un control.

##### Análisis de inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia es una técnica común de laboratorio basada en el uso de unos anticuerpos específicos los cuales están químicamente combinados con colorantes fluorescentes.Se usa para evaluar células en suspensión, cultivadas, en tejidos y en microarrays. Existen dos maneras de realizar el análisis:

La inmunofluorescencia **directa** consiste en ligar un fluoróforo (componente que hace que una molécula sea fluorescente) al anticuerpo de la molécula que buscamos. De esta manera, ambos componentes se enlazarán a la molécula, que podrá ser detectada con microscopio. Se trata de un método rápido aunque el hecho de que el anticuerpo solo encuentre un número limitado de moléculas, lo hace poco sensible.

Por otro lado, la **indirecta**, se basa en la misma idea que la directa pero consta de dos anticuerpos: el anticuerpo primario, que se une a la molécula objetivo, y el secundario, unido al fluoróforo. Es un proceso más complejo y lento, pero más flexible y preciso gracias al número de distintos anticuerpos secundarios y las técnicas de detección que se pueden usar en el anticuerpo primario.

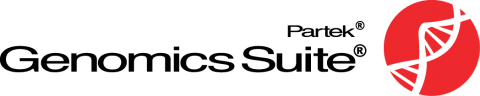
### Tipos de microarrays utilizados

Los microarrays utilitzados fueron Affymetrix GeneChip Human Gene 1.0 STE Arrays, estos son microarrays **de expresión de oligonucleótidos** sintetizados in situ (1 color).

Este tipo de microarray tiene las siguientes características:

* Cada chip contiene muestras de un solo tipo.
* Las sondas se sintetizan directamente sobre el chip.
* Cada gen está representado por un grupo de sondas cortas .



El análisis de microarrays se realizó en archivos CEL utilizando PartekH Genomics Suite Tm, un software mundialmente utilizado para la visualización y el análisis de datos genómicos.

Cabe destacar que:

* Los datos se normalizaron con el método multiaverage
* La eliminación del efecto Batch[[7]](#footnote-6) fue aplicada para las diferentes muestras.
* El Clustering[[8]](#footnote-7), se hizo con Partek Genomics Suite software con Correlación de disimilitud de Pearson.

# Análisis de datos con R

Se analizará una muestra de 11 células de personas.

Estas 11 muestras se han distribuido en 3 grupos .

Los datos obtenidos en formato .CEL

1. Directorios y opciones de trabajo
2. Lectura de Datos
3. Exploración, Control de Calidad y Normalización
4. Realizar algunos gráficos con los datos para hacerse una idea de cómo ha resultado el experimento. Se suele utilizar el paquete “*affycoretools”.* ej: gráfico de degradación, diagrama de cajas[[9]](#footnote-8) y cluster jerárquico.
5. Realizar un control de calidad más formal. Con paquete “*affyPLM”*. ej: gráfico de expresiones relativas y gráfico con errores estandarizados.[[10]](#footnote-9)
6. Normalización y Filtraje, se sumarizan los datos y se genera una medida única por cada probeset para que así los valores sean comparables entre ellos y esten una misma escala[[11]](#footnote-10), tras la normalización se procederá al Filtraje, consiste en eliminar genes que no nos aportan nada.
   1. Para la Normalización, se utilizará el proceso mediante RNA, consiste en 3 etapas: 1. Corrección de Fondo, 2. Normalización para hacer los valores de los arrays comparables,. 3 Sumarización de las diversas sondas asociadas a cada grupo de sondas para dar un único valor.
   2. En el Filtraje, se empleará la función “*nsFilter”*, la cual eliminará todos los genes que varían poco o no tienen anotación.
7. Selección de genes diferencialmente expresados.
8. Se aplicará la aproximación basada en la utilización del modelo lineal general combinada con un método para obtener una estimación mejorada de la varianza.
   * 1. Matriz de diseño: Nuestra matriz de diseño, la modelizaremos como un modelo de un factor con tres niveles. expandedislet.RCtreatment, expandedislet.untreated, Uncultivedislet.untreated
     2. Contrastes: Se formularán preguntas de interés basadas en comparaciones entre los parámetros del modelo. Efecto del RCtreatment en los islotes de células expandidas, Efecto de no tratar los islotes de células expandidas y efecto de no expandir los islotes de células.
     3. Estimación del modelo y selección de genes:
9. Comparaciones múltiples: se realizarán varias comparaciones a la vez, ya que puede resultar importante ver qué genes cambian simultáneamente en más de una comparación[[12]](#footnote-11). Se utilizará la función “decidetests”[[13]](#footnote-12) , esta función permite ajustar los p-valores entre comparaciones y seleccionar los genes que cambian en una o más condiciones. Una diagrama Venn permite visualizar la tabla res.
10. Anotación de resultados: Para identificar de manera más sencilla los genes seleccionados, utilizaremos nombres más informativos que el código probeset.

Para los identificadores, usaremos el paquete de anotaciones de tablas SQL que relacionan los identificadores de cada grupo de sondas con otros más generales como el Gene Symbol o el Entrez.

1. Visualización de los perfiles de expresión: Para visualizar las expresiones de cada gen, se agrupan para destacar los genes que se encuentran up o down regulados simultáneamente constituyendo “perfiles de expresión”. Para esta visualización, se usarán los mapas de color o Heatmaps.

# Bibliografía

Artículo de la investigación:

Russ, H., Sintov, E., Anker-Kitai, L., Friedman, O., Lenz, A., Toren, G., Farhy, C., Pasmanik-Chor, M., Oron-Karni, V., Ravassard, P. and Efrat, S. (2011). *Insulin-Producing Cells Generated from Dedifferentiated Human Pancreatic Beta Cells Expanded In Vitro*. Disponible en: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0025566>

Análisis qPCR:

Biocompare.com. *Quantitative PCR (qPCR) | Biocompare.com*. Disponible en: [https://www.biocompare.com/PCR-Real-Time-PCR/7217-Real-Time-PCR](https://www.biocompare.com/PCR-Real-Time-PCR/7217-Real-Time-PCR/)/

Es.wikipedia.org. (2017). *PCR en tiempo real*. Disponible en: <https://es.wikipedia.org/wiki/PCR_en_tiempo_real>.

Biología Molecular. *Cuantificación de Ácidos Nucleicos*. Disponible en: <https://biologiamolecularinteractiva.wordpress.com/about/cuantificacion-de-acidos-nucleicos/>.

Análisis inmunofluorescencia:

Eurodiagnostica.com. *Immunofluorescence technique*. Disponible en: <http://www.eurodiagnostica.com/index.php?headId=3&pageId=3&catId=10>.

Análisis de datos con R

Sánchez, A. (2009). *Ejemplo de Análisis de Datos de Microarrays con R y Bioconductor*. [online] Ub.edu. Disponible en: <http://www.ub.edu/stat/docencia/bioinformatica/microarrays/ADM/labs/estrogen/Ejemplo_Estrogen.pdf>.

**\* Treball microarray amb R:** [**http://www.ub.edu/stat/docencia/bioinformatica/microarrays/ADM/labs/estrogen/Ejemplo\_Estrogen.pdf**](http://www.ub.edu/stat/docencia/bioinformatica/microarrays/ADM/labs/estrogen/Ejemplo_Estrogen.pdf)

1. Técnica que permite conocer la ascendencia de una célula. [↑](#footnote-ref-0)
2. Estudio de los factores que intervienen en la expresión génica (modifican la actividad del ADN) sin alterar su secuencia. Estos factores no se corresponden a los elementos clásicos de la genética. [↑](#footnote-ref-1)
3. Molécula de ADN que se replica y transmite independientemente del ADN cromosómico. [↑](#footnote-ref-2)
4. Aparato usado en biología molecular que permite realizar los ciclos de temperaturas necesarios para una reacción de amplificación de ADN. [↑](#footnote-ref-3)
5. Dispositivo de laboratorio utilizado para medir los parámetros de la fluorescencia: su intensidad y la distribución de longitudes de onda del espectro de emisión después de la excitación por un cierto espectro de luz [↑](#footnote-ref-4)
6. Función de transferencia que relaciona la entrada con la salida. El método se basa en la relación proporcional entre la concentración y una determinada señal analítica [↑](#footnote-ref-5)
7. Efecto Batch: efecto sistemático al hacer el análisis de microarray de manera grupal. [↑](#footnote-ref-6)
8. Clustering: tarea de agrupar un conjunto de objetos de tal manera que los miembros del mismo grupo sean más similares en algún sentido. [↑](#footnote-ref-7)
9. Este diagrama de cajas se realizará con el mismo código usado en el gráfico de degradación. Expresión logarítmica. [↑](#footnote-ref-8)
10. Si los datos son de calidad, ambos gráficos deben ser centrados y relativamente simétricos. [↑](#footnote-ref-9)
11. Para comprobar si están una escala en la que se puedan comparar, se usará un boxplot de los valores normalizados. [↑](#footnote-ref-10)
12. Si tenemos un número de comparaciones alto, puede ser importante realizar un ajuste de p-valores entre las comparaciones. [↑](#footnote-ref-11)
13. El resultado de este análisis es una tabla *res* que para cada gen y comparación contiene un 1 si el gen está sobrexpresado (up) en esa comparación, 0 si no hay cambio significativo y -1 si está regulado (down). [↑](#footnote-ref-12)