

TABLA DE CONTENIDOS

Tabla de contenidos	v
Índice de figuras	vii
Índice de tablas	viii
Lista de abreviaturas	viii
Resumen	x
Abstract	xii
INTRODUCCIÓN	
1. Síndrome de Sjögren.	1
1.1. Pérdida de homeostasis de la célula acinar.	1
1.1.1. Relación célula-matriz extracelular.	3
1.1.2. Célula acinar y secreción.	5
2. Estrés de retículo endoplásmico y respuesta a proteínas mal plegadas (UPR).	6
2.1 Estrés de retículo endoplásmico.	6
2.2 Respuesta a proteínas mal plegadas (UPR)	7
2.3. Vías de señalización de UPR.	7
2.4 UPR y autoinmunidad	8
2.5 UPR y secreción	9
2.6 Evidencias que sugieren una relación entre estrés de RE, UPR y SS.	11
HIPÓTESIS	14
OBJETIVO GENERAL	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
DISEÑO EXPERIMENTAL	15
MATERIALES Y MÉTODOS	
1. Pacientes e individuos controles.	17
1.1 Tamaño muestral.	17
1.2 Obtención de glándulas salivales labiales (GSLs).	18

2. Determinación de la expresión génica por PCR en tiempo real.	19
2.1 Diseño de partidores para los genes en estudio.	19
2.2 Extracción de RNA total.	19
2.3 Electroforesis en gel denaturante.	20
2.4 Síntesis de cDNA.	21
2.5 PCR convencional.	21
2.6 PCR en tiempo real.	22
2.6.1. Estandarización de la reacción de qPCR.	22
2.7 Análisis de datos.	23
2.8 Detección y análisis de los productos de amplificación.	24
2.9 Análisis estadístico.	24
3. Determinación de proteínas por inmunoquímica.	
3.1 Extracción de proteínas.	24
3.2 Cuantificación de proteínas.	24
3.3 Preparación de la muestra.	25
3.4 Separación electroforética de proteínas.	25
3.5 Western blot.	25
3.6 Análisis estadístico.	26
3.7 Inmunofluorescencia.	26

RESULTADOS

En glándulas salivales labiales humanas de pacientes SS e individuos controles:

1. Expresión génica de XBP-1u, XBP-1s, BiP y PDIA3.	28
2. Expresión de proteínas IRE1 α , XBP-1u, XBP-1s, BiP y PDIA3.	35
3. Expresión génica de EDEM1, SEC61 y ERdj4.	43
4. Localización subcelular de proteína BiP y XBP-1	46

DISCUSIÓN 50

CONCLUSIONES 60

BIBLIOGRAFÍA 61

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** Control de eficiencia y calidad de la extracción de RNA total.
- Figura 2** Evaluación de la pureza del extracto de RNA total.
- Figura 3** Evaluación del cDNA sintetizado.
- Figura 4** Curvas de disociación y amplificación de XBP-1u, XBP-1s, h18S, BiP y PDIA3 para cuatro diluciones de cDNA.
- Figura 5** Gráficos de la relación de expresión de los genes de interés, XBP-1u y XBP-1s, respecto al gen de referencia h18S, evaluado a través de PCR en tiempo real.
- Figura 6** Geles agarosa representativos de los productos obtenidos de qPCR: XBP-1u y XBP-1s.
- Figura 7** Gráficos de la relación de expresión de los genes de interés, BiP y PDIA3, respecto al gen de referencia h18S, evaluado a través de PCR en tiempo real.
- Figura 8** Geles agarosa representativos de los productos obtenidos de qPCR: BiP, PDIA3.
- Figura 9** Niveles relativos de proteína IRE-1 α .
- Figura 10** Expresión de IRE-1 α total en células HSG cultivadas en plano con distintas concentraciones y por distintos tiempos con tunicamicina.
- Figura 11** Niveles relativos de proteína XBP-1u.
- Figura 12** Niveles relativos de proteína XBP-1s.
- Figura 13** Expresión de XBP-1u y XBP-1s en células HSG cultivadas en plano con distintas concentraciones y por distintos tiempos con tunicamicina.
- Figura 14** Niveles relativos de proteína BiP (GRP78).
- Figura 15** Niveles relativos de proteína PDIA3 (ERp57).
- Figura 16** Curvas de disociación y amplificación de EDEM1, SEC61 y ERdj4 para cuatro diluciones de cDNA.
- Figura 17** Localización subcelular de BiP en individuos controles y pacientes SS.
- Figura 18** Inmunofluorescencia en células inflamatorias en pacientes SS.
- Figura 19** Localización subcelular de XBP-1 en individuos controles y pacientes SS.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Características demográficas, serológicas e histológicas de pacientes SS y grupo control.
Tabla 2	Partidores sintetizados: XBP-1u, XBP-1s, BiP, PDIA3 y h18S.
Tabla 3	Curvas estándar para XBP-1u, XBP-1s, BiP, PDIA3 y h18S para cuatro diluciones de cDNA.
Tabla 4	Condiciones para inmunoblot de IRE1 α , XBP-1u, XBP-1s, BiP, PDIA3 y β -actina.
Tabla 5	Partidores sintetizados: EDEM1, SEC61, ERdj4.
Tabla 6	Curvas estándar para EDEM1, SEC61 y ERdj4 para cuatro diluciones de cDNA.
Tabla 7	Relación de expresión de genes DEM1, SEC61 y ERdj4 en pacientes SS respecto a controles.

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
Ach	Acetilcolina
ANA	Anticuerpos antinucleares
ATF4	Factor activador transcripcional 4
ATF6	Factor activador transcripcional 6
BiP/GRP78	Binding immunoglobulin protein/78-kDa glucose-regulated protein
BSA	Albúmina de suero bovino
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
EDEM	ER degradation enhancer, mannosidase α -like1
eIF2a	Factor iniciador de la traducción 2 α
ER	Retículo endoplásmico rugoso
ERAD	Endoplasmic reticulum-associated protein degradation (degradación de proteínas asociada a retículo endoplásmico)
FR	Factor reumatoideo
GAPDH	Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa
GRP94	94-kDa glucose-regulated protein
GS	Glándulas salivales
HEK293T	Human embryonic kidney 293
HSG	Human salivary glands
IL-1b	Interleuquina 1 β
IL-6	Interleuquina 6
IRE-1a	Inositol requiring enzyme 1 alpha
LM5	Laminina 5
MEC	Matriz extracelular
MMPs	Metaloproteinasas
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero

NO	Óxido nítrico
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PERK	Protein kinase (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase
RE	Retículo endoplásmico
RER	Retículo endoplásmico rugoso
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
RT	Transcripción inversa
SNAREs	Soluble NSF attachment protein receptor
SS	Síndrome de Sjögren
SSp	Síndrome de Sjögren primario
TGN	Trans-Golgi
TIMPs	Inhibidores tisulares de metaloproteinasas
Tu	Tunicamicina
UPR	Unfolded protein response (Respuesta a proteínas mal plegadas)
XBP-1	X-binding protein 1
XBP-1s	X-binding protein 1 procesada
XBP-1u	X-binding protein 1 no procesada