



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**ANÁLISIS DEL PERFIL DE LA EXPRESIÓN DE mRNAs EN CEREBRO DE RATAS**  
**(*Rattus norvegicus*) HIPERGLUCÉMICAS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**

**BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**JULIO CÉSAR LUNA ROJAS**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**Dra. Ana Victoria Vega Salcedo**

Tlalnepantla de Baz, Estado de México, 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la oportunidad de realizar mis estudios de bachillerato y profesionales.

A la Facultad de estudios Superiores Iztacala, por ser mi segunda casa y las inolvidables experiencias.

A mi tutora y amiga la Dra. Ana Victoria Vega Salcedo, por creer en mis habilidades como investigador, por su tiempo, paciencia, el espacio que me brindo en su equipo de investigación y los incontables recursos que me facilitó. Gracias.

Al Dr. Alonso Antonio Vilches Flores, por su apoyo, revisión a esta tesis y por los recursos facilitados.

A la Dra. Bertha Segura, por la revisión a esta tesis.

Al Dr. Santiago Sigrist Flores, por la revisión de este trabajo.

Al Dr. Juan Manuel Arias, por los consejos y revisión de este trabajo.

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM Proyecto IN223116, “Interacciones proteína-proteína de los canales de sodio dependientes de voltaje”, otorgado a la Dra. Ana Victoria Vega Salcedo, y el proyecto IN225819, “Estudio de los mecanismos de acción del sistema endocannabinoide en islotes pancreáticos aislados de modelos experimentales con diabetes inducida”, otorgado al Dr. Alonso Antonio Vilches Flores. Asimismo, se contó con el apoyo del CONACYT al proyecto A1-S-36984, otorgado a la Dra. Ana Victoria Vega Salcedo.

Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida.

## **DEDICATORIAS**

A mi madre María Elena, por darme la vida, enseñarme que todo es posible con esfuerzo y determinación, por ser siempre mi ejemplo, mi apoyo, por nunca dejarme solo, por los sacrificios hechos para que todo esto sea posible, este triunfo también es tuyo, te amo. Gracias.

A mi hermano Fernando, por siempre ser un apoyo, por todos los buenos momentos y por siempre ser mi compañero, te dedico este logro, espero ver los tuyos muy pronto.

A Paola, gracias por apoyarme, entenderme, y no soltar mi mano en los momentos mas difíciles. Gracias.

A mis amigos: Jadir, Antonio, Karime, Roberto, Mariana y todos aquellos con los que Compartí inolvidables momentos dentro y fuera de Iztacala, gracias por regalarme un momento de sus vidas y formar parte de la mía.

A mis amigos y compañeros del laboratorio: Andrés, Erik, Sergio, Luis, Jess, Alexa, Sarahí, y Lucía, por las incontables horas de experimentación, análisis de resultados, risas y bromas.

A los profesores que me guiaron durante mi formación, por el apoyo, consejos y por ser fuente de inspiración para desempeñar la noble labor de ser biólogo.

Gracias a todos los que creyeron en mí y más aún a los que nunca dejaron de hacerlo.

## INDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>9</b>
1.1. Diabetes: definición y comorbilidades	
1.2. Neuropatías: definición y tipos	
1.2.1. Evidencias de la hiperglucemia produce neuropatías	
1.2.2. Mecanismos conocidos de la degeneración neural diabética	
1.3. Evidencias que relacionan la hiperglucemia o diabetes con la EA	
1.4. La hiperglucemia induce cambios a nivel de mRNA	
<b>2. HIPÓTESIS.....</b>	<b>17</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>18</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
4.1. Objetivo general	
4.2. Objetivos particulares	
<b>5. METODOLOGÍA.....</b>	<b>20</b>
5.1. Inducción de hiperglucemia	
5.2. Disección de cerebro de rata	
5.3. Extracción de RNA	
5.3.1. Preparación de tejido	
5.3.2. Integridad y concentración	
5.4. Tecnología de microarreglos	
5.4.1. corrección de fondo	
5.4.2. valor de R	
5.4.3. filtrado por intensidad	
5.4.4. selección de expresión diferencial de genes	
5.5. Análisis de datos en el programa DAVID <i>bioinformatic tool</i>	

<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>25</b>
6.1. Validación del experimento de microarreglos	
6.2. Análisis de microarreglos	
6.3 Función de las proteínas susceptibles de regulación por la hiperglucemia	
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>35</b>
7.1. Genes involucrados en la EA	
7.2. Genes involucrados en neuropatías	
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>40</b>
<b>9. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>41</b>
<b>10. REFERENCIAS.....</b>	<b>42</b>

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Geles de agarosa al 1%, teñido con Bromuro de Etidio.....	<b>26</b>
---	-----------

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Niveles de glucosa inicial y final de ratas control CN (vehículo), así como de ratas tratadas con STZ dosis única 65 mg/ kg IP.....	<b>26</b>
--	-----------

Tabla 2. Lista de subgrupo de genes UP > 1.5  que aumentaron su expresión con respecto al control.....	<b>27</b>
--	-----------

Tabla 3. Lista de subgrupo de genes DOWN > 1.5  que disminuyeron su expresión con respecto al control.....	<b>30</b>
--	-----------

Tabla 4. Lista de genes que están involucrados en el desarrollo, progresión o que brindan efectos protectores contra EA y neuropatías.....	<b>33</b>
--	-----------

## LISTA DE ABREVIACIONES

Diabetes Mellitus (DM)

Diabetes mellitus tipo 1 (DMT1).

Diabetes mellitus tipo 2 (DMT2)

Sistema nervioso central (SNC)

Sistema nervioso periférico (SNP)

Sistema nervioso autónomo (SNA)

Estreptozotocina (STZ)

Ácido Desoxirribonucleico (DNA)

Ácido Desoxirribonucleico complementario (cDNA)

Ácido Ribonucleico mensajero (mRNA)

Proteína básica de mielina (MBP)

Glicoproteína asociada a mielina (MAG)

Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD)

Enfermedad de Alzheimer (EA)

Adenosín Trifosfato (ATP)

Ácido gama aminobutírico (GABA)

Productos finales de glicación avanzada, (AGE) *Advanced glycation end products*

*N*-Épsilon carboximetil lisina (CML)

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Tampón fosfato salino (PBS)

Fuerza relativa centrífuga (RCF)

Microlitro ( $\mu$ L)

Concentración molar (M)

Potencial de hidrogeno (pH)

bromuro de etidio (BrEt)

Receptor de las hormonas luteinizante y gonadotropina coriónica (LHCGR)

Cinasa dependiente de ciclina 5 (Cdk5)

Subunidad Alpha 5 del receptor GABA<sub>A</sub> (GABRA5)

Factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ )

Inhibidor tisular de metalopeptidasa (TIMP)

Receptores de glutamato metabotrópico (mGluR)

Especies reactivas de oxígeno (ROS)

Receptor transportador de glucosa (GLUT2)



## RESUMEN

La Diabetes Mellitus (DM) es una enfermedad sistémica, crónica y degenerativa, de carácter heterogéneo, con grados variables de predisposición hereditaria y con participación de diversos factores ambientales. La diabetes se caracteriza por una condición de hiperglucemia crónica debida a una deficiencia en la producción de insulina en las células  $\beta$ -pancreáticas, o de su acción sobre sus tejidos blanco. La hiperglucemia crónica es nociva para algunos tejidos. Por ejemplo, se sabe que produce daño a nivel de tejido nervioso que resulta en neuropatías las cuales son un conjunto de alteraciones en el sistema nervioso que involucran cambios en procesos metabólicos, desmielinización y atrofia axonal. Evidencias previas sugieren que niveles elevados de glucosa en sangre están vinculados a cambios en la expresión de mRNA en tejido adiposo y muscular, sin embargo, hasta el momento no se ha realizado esta clase de análisis en SNC. El objetivo de este trabajo fue analizar los cambios en el perfil de expresión de mRNA inducidos en respuesta a la hiperglucemia en el SNC de rata (glucemia  $\geq 250$  mg/dl), mediante la tecnología de microarreglos. Nuestros resultados arrojaron datos de cambio en la expresión de 1317 genes, de los cuales 573 aumentaron y 744 disminuyeron su expresión con respecto al control normoglucémico, de acuerdo con nuestra investigación bibliográfica encontramos que 3 de estos mensajeros (CDK5, GABRA5, TGF- $\beta$ 2) están involucrados en desarrollo o progresión de la enfermedad de Alzheimer (EA). Dos más, mGlu1 y TIMP-2, se han reportado alterados en neuropatías. Nuestros resultados indican que la hiperglucemia produjo cambios en la expresión de mensajeros en SNC que previamente se han descrito e involucrado en el desarrollo de la EA y neuropatías.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Diabetes: definición y comorbilidades

La Diabetes Mellitus (DM), es una enfermedad sistémica, crónica, degenerativa, de carácter heterogéneo, con grados variables de predisposición hereditaria y con participación de diversos factores ambientales, que se caracteriza por una condición de hiperglucemia crónica debida a la deficiencia en la producción de insulina en las células  $\beta$ -pancreáticas o de la acción de la insulina sobre tejido blanco, lo que se denomina resistencia a insulina; todo esto afecta el metabolismo intermedio de hidratos de carbono, proteínas y grasas (ADA 2019, NOM-015-SSA2-2010; Polonsky, 2012).

Hasta el 2006, en México había 5.7 millones de personas diagnosticadas con DM, así mismo en la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) refirió en 2012 un aumento a 6.4 millones de personas con este padecimiento, es decir, el 9.2% de la población adulta. La gran mayoría de las personas que sufren este trastorno presentan sobrepeso debido a la ingesta de una dieta hipercalórica y sedentarismo, los cuales son factores que junto a otros, como la hipertensión, se correlacionan directamente con el aumento en la incidencia de síndrome metabólico. (Villalpando *et al.*, 2010).

La característica principal de estos padecimientos es la condición de hiperglucemia, que de manera crónica es nociva para algunos tipos de tejidos (Taylor, 1988). Por ejemplo, provoca anomalías en la microcirculación y lesiones microvasculares como aneurismas capilares retinianos (Engerman *et al.*, 1977), produce daño a nivel de tejido nervioso que resulta en neuropatías (Nukada, 1992), promueve cambios cerebrovasculares durante estados de isquemia y afecta recuperación hemodinámica en la reperfusión (Kawai *et al.*, 1997), está involucrada en el deterioro cognitivo, de forma similar a la enfermedad de Alzheimer (Knopman, 2001), y en enfermedades cardiovasculares relacionadas también con síndrome metabólico (Charles, 2003).

## 1.2. Neuropatías: definición y tipos

Las neuropatías diabéticas son un conjunto de síntomas heterogéneos de alteraciones en el sistema nervioso periférico (SNP), sistema nervioso autónomo (SNA) y sistema nervioso central (SNC) que involucran alteraciones en procesos metabólicos, desmielinización, atrofia axonal, y puede presentar distintas manifestaciones clínicas (Thomas, 1997). Estas fisiopatologías están asociadas principalmente a condiciones de hiperglucemia (Boulton *et al.*, 2005). El panel de expertos de Toronto en neuropatías diabéticas ha provisto los criterios de diagnóstico de este tipo de afecciones (Tesfaye *et al.*, 2010; Dyck *et al.*, 2011).

Por ejemplo, la polineuropatía simétrica distal es la forma más común de neuropatía diabética que afecta aproximadamente a la mitad de todos los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), progresa de forma lenta e inicialmente se experimenta pérdida sensorial en dedos y pies y resulta en disfunción de fibras nerviosas, consistente con alteraciones metabólicas en el SNP (Russell, 2014).

La neuropatía de fibras pequeñas se caracteriza por un dolor superficial y ardiente en los pies causado por la participación preferencial del nervio no mielinizado; estas fibras median el dolor, la sensación de temperatura y la función autónoma. Las fibras pequeñas mielinizadas y no mielinizadas transmiten sensaciones de tacto ligero, dolor y temperatura, mientras que las fibras grandes son responsables de la sensación vibratoria, las neuropatías de fibra pequeña se ven a menudo en pacientes con alteraciones en la tolerancia a la glucosa (Zilliox *et al.*, 2011).

Por otra parte, la neuropatía autonómica está asociada con el incremento en el riesgo de mortalidad, especialmente en presencia de neuropatía cardíaca autonómica y los síntomas dependen del componente del SNA afectado, pero pueden incluir taquicardia en reposo, intolerancia al ejercicio, anomalías motoras gástricas y disfunción eréctil., Los signos de esta enfermedad se presentan hasta en 20% de todos los pacientes diabéticos, el porcentaje se eleva a 75% en diabetes mellitus tipo 1 (DMT1). (Spallone *et al.*, 2011).

La incidencia de neuropatías es mayor en pacientes con DMT1 que puede ser hasta del 59%, mientras que el dolor neuropático es uno de los resultados más comunes en pacientes con prediabetes y DMT2. (Smith *et al.*, 2006)

### **1.2.1. Evidencias de que la hiperglucemia produce neuropatías**

Existen evidencias que relacionan a la hiperglucemia sostenida con la degeneración neuronal a través de la producción de componentes que pueden acumularse en el tejido nervioso (Nukada, 2014).

Se ha reportado que la pérdida de fibras nerviosas mielinizadas es una característica de isquemia en nervios proximales. En pacientes con polineuropatía simétrica distal las lesiones proximales contribuyen a la pérdida difusa de fibras distales (Dyck, 1986).

Por otro lado, Nukada, en 1992, evaluó el efecto patológico de la isquemia en ratas hiperglucémicas inducidas con estreptozotocina (STZ), mediante la inyección intra arterial de microesferas para ocluir la microvasculatura del nervio ciático. A las 20 semanas los nervios ciáticos y tibiales mostraron daño como oscurecimiento, inflamación a nivel de axón y adelgazamiento de la mielina, además la evaluación morfométrica confirmó una mayor frecuencia de fibras mielinizadas anormales en modelos de nervios diabéticos, sugiriendo una mayor susceptibilidad a condiciones de isquemia.

En un modelo de neuropatía diabética periférica con cultivo de células de Schwann del nervio ciático de rata, se observó una reducción en la expresión a nivel de mRNA de proteínas de mantenimiento como la proteína básica (MBP) y la glicoproteína asociada (MAG), por otro lado, en ambos modelos resultó una reducción de la expresión del receptor de insulina (IR). Estos cambios en la expresión de estas proteínas se pudieron revertir con tratamiento de insulina (Rachana *et al.*, 2016).

### **1.2.2. Mecanismos conocidos de la degeneración neural diabética**

Se han hallado evidencias de que anomalías vasculares conducen a la pérdida por isquemia de fibras nerviosas, esta condición cuando es acompañada de hiperglucemia se vuelve un factor clave en el desarrollo de neuropatías y retinopatías (Nukada, 2014).

La hiperglucemia modifica la regulación metabólica en vías como la del poliol y pentosa fosfato, que dan paso a reacciones y productos intermedios que pueden dañar axones y células de Schwann; Cuando los niveles de glucosa intracelular se elevan, se inhibe la enzima glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD), la aldosa reductasa, en la vía del poliol, convierte la glucosa en sorbitol (revisado por Cashman, 2015). En modelos animales diabéticos inducidos con aloxan se demostró la acumulación de sorbitol y otros polioles como el inositol en varios tejidos, incluyendo tejido nervioso como es el nervio ciático y la médula espinal (Gabbay, 1966).

También se ha reportado que en cultivos de células de neuroblastoma expuestas a 30mM de D- glucosa, estas acumulan 40% menos Myo-inositol con respecto al control (1mM), esto es debido a que el sorbitol reduce los niveles de componentes de membrana, impidiendo el ingreso de estos a la célula. Esta alteración en membranas axonales puede provocar la incapacidad de propagar el potencial de acción y está involucrado en el desarrollo de neuropatía diabética (Yorek *et al.*, 1987).

Unos de los factores más estudiados en el desarrollo de las neuropatías es la coexistencia de patologías microvasculares, que se caracterizan por el engrosamiento de la membrana basal, degeneración de pericitos e hiperplasia de células endoteliales en micro vasos endoneurales. Estos cambios vasculares se correlacionan fuertemente con patologías nerviosas. El denominador común entre las anomalías metabólicas y vasculares es la disfunción endotelial, un paso clave en el inicio de eventos celulares que evolucionan hacia el desarrollo de complicaciones vasculares de la diabetes. La disminución de la producción y la función de los vasodilatadores derivados del endotelio, como el óxido nítrico, y la exagerada producción de vasoconstrictores, como la endotelina-1, conducen a una disfunción

endotelial, dando como resultado un tono vascular elevado, que culmina en daño macro y microvascular (revisado por Nukada, 2014). Aunque a la fecha el enfoque predominante es que el deterioro neuronal se debe al desarrollo de complicaciones microvasculares, estudios recientes indican que el deterioro neuronal precede al deterioro vascular (Grey y Gardner, 2015; Muc *et al*, 2018).

### **1.3. Evidencias que relacionan la hiperglucemia o diabetes con la EA**

Otra patología de gran relevancia, por su impacto en la calidad de vida del enfermo, en la que se ha visto que la hiperglucemia puede ser muy importante, es la patología de la enfermedad de Alzheimer (EA). La EA es un trastorno en el cerebro, que se caracteriza por la acumulación de la proteína amiloide en forma de pequeñas fibrillas que se entrelazan dentro de las neuronas llamadas ovillos neurofibrilares, que a su vez almacenan a la proteína tau (Bennet *et al.*, 2004). Estas acumulaciones generan cambios en el comportamiento intelectual, así como fallas en la memoria y orientación. Los síntomas incluyen pérdida de la memoria, confusión, la conducta, la personalidad, problemas para pensar y cambios en el lenguaje.

Se ha reportado que hasta el 50% de adultos mayores presentan intolerancia a la glucosa, además en ancianos no dementes y no diabéticos la hiperinsulinemia crónica está asociada a deterioro cognitivo (revisado por Erol, 2008) e igualmente está relacionada con demencia por Alzheimer (Gasparini, 2002), mientras que la enfermedad cerebrovascular también se ha vinculado al desarrollo de la EA (Román, 2005).

Existen evidencias de que alteraciones metabólicas derivadas de la diabetes se encuentran asociadas a la disfunción cognitiva, tales como la inducción de proteólisis y lipólisis en cerebros que presentan la EA (Revisado por Hoyer, 1998).

Hoyer y colaboradores (2002) reportan que en pacientes con Alzheimer disminuye el uso de glucosa por parte del cerebro, aun cuando el suministro a este órgano era normal. Las alteraciones en el metabolismo de la glucosa en el cerebro están involucradas también con disminución en la síntesis de acetilcolina, glutamato,

aspartato, ácido gama aminobutírico (GABA), glicina y ATP (Blum-Degen *et. al*, 1995).

Por otro lado aunque clásicamente se considera que SNC es insensible a la insulina, cada vez es mas claro que la insulina cruza la barrera hematoencefálica y que cumple un papel importante en procesos cognitivos y tróficos neuronales (Watson, 2006). Se ha sugerido que anomalías en la transducción de señales asociadas a receptor de la insulina conducen a insuficiencia en la energía metabólica que es provista por la glucosa y promueven la biosíntesis de productos finales de glicación avanzada (Advanced glycation end products, *AGE por sus siglas en inglés*). Durante el envejecimiento cerebral la acumulación de AGE's es acompañada de cambios a nivel celular y molecular como lo son anomalías en la síntesis de neurotransmisores, en productos de membrana y la producción de radicales libres (Hoyer, 2002). En este panorama, la carencia de insulina y la disrupción en la señalización que promueve la síntesis de AGE puede agravar la situación.

Al igual que con las neuropatías periféricas, en la EA se ha evidenciado degeneración neural. Por ejemplo, tau es una proteína neuronal del citoesqueleto, que se une a los microtúbulos promoviendo la estabilización de la tubulina, y anomalías en la función de la insulina y poca producción de ATP, producen la acumulación de proteína  $\beta$ -amiloide e hiperfosforilación de tau, como un mecanismo compensatorio de la célula neuronal para disminuir estrés oxidativo (Gasparini *et al.*, 2001, Moreira *et al.*, 2006). En este sentido, es importante mencionar, que los AGE están involucrados en la disfunción vascular y esto, a su vez, se relaciona con el estrés oxidativo, lo cual promueve la formación de depósitos de la proteína  $\beta$ -amiloide y ovillos neurofibrilares, y los receptores de productos finales de glicación avanzada (RAGE) también funcionan como receptores de la proteína  $\beta$ -amiloide y participan en el desarrollo de EA. (Buccala y Cerami, 1992; Brownlee, 1995; Munch *et al.*, 1997; Deane, 2003).

En un estudio llevado a cabo en ratas Wistar hiperglucémicas (inducidas con STZ) se evidenció que los niveles de AGE, en este caso *N*-Épsilon carboximetil lisina (CML), fueron significativamente más elevados en vasos cerebrales, comparado con ratas normo glucémicas; además, niveles elevados de AGE en pacientes con

enfermedad cerebrovascular también se ven asociados con deterioro cognitivo (Van Deutekom, 2008; Beeri, 2011).

#### **1.4. La hiperglucemia induce cambios a nivel de mRNA**

Los avances tecnológicos en técnicas como la PCR en tiempo real y los microarreglos han permitido profundizar en el conocimiento de los efectos de la hiperglucemia a nivel molecular en distintos tejidos, y más específicamente sobre cambios en la expresión genética.

Empleando modelos de ratas obesas (*ob*) y diabéticas (*B6*), y las crías entre estas cepas, Nadler y colaboradores (2000) identificaron cambios en la expresión de 200 genes involucrados con el desarrollo de obesidad y 88 genes en tejido adiposo que se correlacionan con la transición de obesidad normoglucémica a obesidad acompañada de hiperglucemia.

Por otro lado Meugnier y colaboradores (2007) analizaron la expresión global de genes con muestras de tejido humano de músculo esquelético (*vastus lateralis*) y tejido adiposo subcutáneo abdominal en condiciones de experimentales de hiperglucemia (*hyperglycemic-euinsulinemic clamp*), utilizando somatostatina para evitar la interferencia de insulina; encontraron cambios en la expresión de 316 genes en músculo esquelético y 336 genes en tejido subcutáneo, aproximadamente el 80% de genes en ambos tejidos disminuyeron su expresión durante la prueba. Se comprobó mediante PCR en tiempo real el aumento de la expresión de 7 genes, algunos de ellos vinculados a la familia de las Metalotioneínas (MT1X, MT2A); esta es conformada por proteínas ricas en cisteína que son captadoras de radicales libres, están involucradas en la homeostasis de metales de importancia fisiológica y son inducidas en respuesta a la producción de especies reactivas de oxígeno. También se vio un aumento importante en la expresión del mRNA del gen FOXO1 en músculo esquelético, que brinda protección contra estrés oxidativo; esta condición e hiperglucemia son factores clave para el desarrollo de neuropatías entre otras comorbilidades.



Estos estudios sugieren que niveles elevados de glucosa en sangre se vinculan a cambios en la expresión de ARNm en tejido adiposo y muscular, sin embargo, hasta el momento no se ha realizado esta clase de análisis en SNC.

Estos resultados nos dieron pie a preguntarnos si la hiperglucemia puede intervenir en la expresión de mensajeros involucrados con el desarrollo de EA y otras neuropatías. Para hacer un análisis más amplio decidimos usar la técnica de microarreglos, lo que nos permitirá analizar simultáneamente la expresión diferencial de 11,000 genes.

## **2. HIPÓTESIS**

La hiperglucemia sostenida es una condición frecuente en pacientes con DM. Se ha visto que la hiperglucemia produce cambios transcripcionales en tejido adiposo y en músculo, por lo que se propone que durante estos períodos también ocurren cambios a nivel transcripcional de genes en SNC, en especial de aquellos involucrados en el desarrollo de Enfermedad de Alzheimer o alguna otra neuropatía.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Se estima que en el mundo al menos 50 millones de personas sufren la EA o algún tipo de demencia (Patterson, 2018); por otro lado, la incidencia de distintos tipos de neuropatías ha ido en aumento. Ambas patologías han sido asociadas a diabetes o alguna de sus comorbilidades, siendo la hiperglucemia el factor detonante, nos parece importante entender los cambios en la expresión de mensajeros que pueden verse involucrados en la progresión y/o desarrollo de la EA y neuropatías.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo general**

Analizar los cambios en el perfil de expresión de mRNA en respuesta a la hiperglucemia en el SNC de rata.

### **4.2. Objetivos particulares:**

- Obtener muestras de RNA con buena calidad y pureza del cerebro de ratas normo e hiperglucémicas para realizar el experimento de microarreglos con ayuda de la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular
- Analizar, seleccionar e investigar bibliográficamente los mensajeros de genes que mostraron un cambio significativo en su nivel de expresión en los experimentos de microarreglos y el papel del subgrupo de genes seleccionados en desarrollo de enfermedades degenerativas (EA y neuropatías).

## **5. METODOLOGÍA**

### **5.1. Inducción de hiperglucemia en ratas**

El modelo animal de diabetes experimental se estableció utilizando 4 ratas (*Rattus Norvegicus*) adultas, con un peso corporal de 250g - 300g, con acceso a agua y comida *ad libitum*, bajo las normas establecidas por la comisión de bioética de la FES Iztacala. La mitad de los animales, fueron tratados con STZ (Sigma, S0130) administrada en dosis única de 65 mg/ kg peso corporal, vía intraperitoneal, diluida en una solución de citrato 0.1 M, pH 4.5 (vehículo). El grupo control fue inyectado vía intraperitoneal con solución de citrato 0.1 M, pH 4.5, únicamente.

Previo al tratamiento se realizó una medición de los niveles de glucosa con el glucómetro Glucocard 01 sensor (Arkay / 78534). Se llevó a una segunda medición 72 h después de la administración de STZ y solo aquellas ratas que presentaron valores  $\geq 250$  mg/ dl fueron consideradas en el grupo experimental.

Las 4 ratas se sacrificaron 72 hrs después del establecimiento de la hiperglucemia por el método de decapitación, previa sedación con pentobarbital (6.3%) en dosis única de 70 mg/kg, administrado vía intraperitoneal.

### **5.2. Disección de cerebro de rata**

Una vez sacrificados los animales se realizó la disección del músculo que recubre la región dorsal del cuello, se mantuvo el escalpelo al nivel de la parte posterior del cráneo y se perforó el hueso interparietal, se extrajo el techo del cráneo hasta exponer el cerebro, se obtuvo una muestra de 100 mg de cerebro principalmente cortex, se lavó en tampón fosfato salino (PBS) 1x ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mmol/ L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.8 mmol/ L, KCl 2.7 mmol/ L, NaCl 137 mmol/ L).

### **5.3. Extracción de RNA**

#### **5.3.1. Preparación de tejido.**

Cuando se trabaja con tejidos ricos en enzimas degradativas se recomienda obtener fragmentos de 100 mg y se agregó 1 ml de *TRIzol* (Invitrogen, 15596026), éste es un reactivo desnaturizante.

- Se vertió el *TRIzol* con 100mg de córtex en un homogeneizador *Tissue grinder 7725T-3*, se pulverizó y la mezcla se colocó en un tubo de 1.5ml, y se centrifugó a 14,572 RCF durante 10 min.
- La fracción sobrenadante se recuperó y se le agregaron 200µL de cloroformo grado molecular, se agitó vigorosamente 15s, la mezcla se incubó durante 2 min y se centrifugó a 14,572 RCF por 15 min a 4°C.
- Con ayuda de una micropipeta se extrajo la fase acuosa, sin perturbar la fracción fenólica que contiene DNA y proteínas, y se agregó el mismo volumen de isopropanol, se incubó 10 min y se centrifugó a 14,572 RCF durante 10 min a 4°C, posteriormente se decantó el sobrenadante.
- En este paso ya se puede apreciar una pastilla correspondiente al RNA precipitado, se agregó 1 ml de etanol 70% grado molecular, se centrifugó a 8,331 RCF durante 5 min a 4°C, se decantó el sobrenadante y el resto de etanol se evaporó en campana de flujo laminar (5-10 min), finalmente se resuspendió la pastilla en 50 µL de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC).

### 5.3.2. Integridad y concentración

La cuantificación de concentración y pureza se realizó por medio del espectrofotómetro Ultrospec 330 Pro (Amersham Bioscience), en espectro UV, empleando una dilución 1:100 y un volumen de 300 µl, la razón A260/A280 es aquella en la cual hay una correlación entre la concentración de proteínas y ácidos nucleicos en una muestra, y es preferente un cociente con valor mayor a (>1.7).

Para verificar de integridad y calidad del RNA se empleó el protocolo de electroforesis en gel de agarosa al 1%. Las muestras de RNA se desnaturalizaron a 95°C en buffer de carga 2X (95% formamida, 0.025% SDS, 0.025% azul de bromofenol, 0.025% xylene cyanol FF, 0.025% bromuro de etidio, y 0.5 mM EDTA) la muestra se separó durante 60 min, a 85 V empleando bromuro de etidio (BrEt), como marcador fluorescente.

### 5.4. Tecnología de microarreglos

El principio de la tecnología de microarreglos se basa en la hibridación complementaria entre ácidos nucleicos, donde fragmentos de DNAC representativos de múltiples genes son adheridos a un soporte sólido, por otro lado, los blancos, mRNA libre flotante o cDNA, son marcados con colorantes fluorescentes.

Cuando la muestra marcada se hibrida con el microarreglo, cada sonda se une a su secuencia complementaria, los cDNA que no son complementarios para la sonda fueron removidos mediante una serie de lavados. A mayor número de cDNA marcado, mayor fluorescencia. El cambio en abundancia relativa dentro de muestras individuales proporciona información sobre vías complejas y procesos celulares alterados en una enfermedad o condición particular (Mirnics y Pevsner, 2014). Esta técnica se llevó a cabo en colaboración con la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular, Para el análisis de los datos se empleó el paquete *GenArise Microarray Analysis Tool*, una herramienta que permite realizar el análisis de expresión diferencial de genes de microarreglos. Antes de llevar a cabo el análisis este software lleva a cabo una serie de transformaciones en los datos para eliminar mediciones de baja calidad, ajustar la intensidad de medición y así facilitar comparaciones (Gómez-Mayén *et al.*, 2006).

Las muestras fueron marcadas dos marcadores fluorescentes: Cy3 para el control y Cy5 para el tratamiento. El colorante Cy3 emite una coloración amarillo-verdoso, es excitado a 550 nm y emite a 570 nm, mientras que el colorante Cy5 es excitado a 650 nm y emite fluorescencia a 670 nm, estos colorantes sintéticos pertenecen a la familia (no sistemática) de las cianinas en el grupo de la polimetina. El RNA o DNAC se marca con el colorante que se ha sintetizado para transportar un grupo reactivo de éster N-hidroxisuccinimidil (éster NHS). (Conley *et al.*, 2008).

#### **5.4.1. Corrección de fondo**

La acción de corrección de fondo consiste en restar la intensidad de lectura fondo de Cy3 de la intensidad de lectura de primer plano de Cy3 (control), y la misma de Cy5 de la intensidad de primer plano de Cy5 (tratamiento) para cada punto en el microarreglo.

#### 5.4.2. Valor de R

Después de esto, se calcula la relación de expresión diferencial logarítmica, esta relación está representada por  $R = \log_2(\text{Cy5}) - \log_2(\text{Cy3})$ , GenArise usa logaritmos de base 2 para R, por lo que la relación es unidades de cambio doble (*2-fold change*).

#### 5.4.3. Filtrado por intensidad

Con el fin de eliminar aquellos puntos donde la intensidad se acercase a su fondo correspondiente, cada valor de Cy3 en el punto (del inglés *spot*) debe ser mayor que dos desviaciones estándar de los valores de fondo de Cy3, el mismo criterio para Cy5. De otra forma el elemento es eliminado.

#### 5.4.4. Selección de expresión diferencial de genes

El objetivo de *GenArise* es identificar cuáles de los genes muestran buena evidencia de ser expresados diferencialmente. Esta función identifica genes expresados diferenciales calculando un *Z-score* dependiente de la intensidad. Se emplea un algoritmo para obtener la media y la desviación estándar dentro de una ventana que rodea cada punto de datos, y definimos un *Z-score* donde Z mide el número de desviaciones estándar de un punto de datos que es la media, esto resulta en una lista para genes que se sobre expresan (del inglés *overexpression*) que para fines prácticos se abrevia como UP y también una lista de genes que disminuyen su expresión (del inglés *downregulation*) la cual se abrevia como DOWN.

$$Z_i = (R_i - \text{media}(R)) / \text{sd}(R)$$

Donde  $Z_i$  es el valor de *Z-score* de cada elemento,  $R_i$  es la relación logarítmica de cada elemento, y  $\text{sd}(R)$  es la desviación estándar de la relación logarítmica.

Con este criterio, los elementos que presentan un *Z-score* >2 desviaciones estándar serían genes expresados diferencialmente significativamente (Gómez-Mayén *et al.*, 2006).



### **5.5. Análisis de datos en el programa DAVID *bioinformatic tool***

A partir de la lista obtenida de genes expresados diferencialmente de los experimentos de microarreglos se inició el análisis de las que tuvieron un z-score  $>|1.5|$  desviaciones estándar con respecto a la media, esto se llevó a cabo con la herramienta bioinformática DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>), la cual permite una gama de análisis que incluyen vías de señalización y anotaciones funcionales de la lista de proteínas o genes de interés.

Se realizó una conversión de las listas originales para identificar aquellos genes que se reportan también en la base de datos del NCBI *National Center for Biotechnology Information* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), este análisis se llevó a cabo empleando el identificador REFSEQ MRNA y la herramienta de conversión (*Gen ID conversion tool*), se obtuvo una lista con el número de identificación y nombre de cada gen que coincidió en la base de datos *Genbank* NCBI. Debido a se realizaron 2 experimentos de microarreglo en las mismas condiciones, una vez que se tuvo el número de identificación se procedió a comparar las listas de genes que aumentan su expresión *UP* 1.5 y que bajaron su expresión *DOWN* 1.5 para seleccionar sólo aquellos que presentaron un patrón de expresión consistente en ambos experimentos, posteriormente se procedió a investigar en el NCBI cada gen de este subgrupo.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Validación del modelo de hiperglucemia

Para analizar los cambios en la expresión génica en respuesta al daño producido por hiperglucemia se utilizó un modelo de ratas tratadas con STZ, pasadas 72h de la inducción se pudieron observar cambios en los valores de concentración de glucosa en sangre con respecto al control, con valores de 381 y 559 mg/dl, lo cual es consistente con el daño que produce este fármaco a las células  $\beta$ - pancreáticas y el subsecuente aumento de los niveles de glucemia y que puede ser comparado en la Tabla 1.

Adicionalmente, antes de iniciar con los microarreglos, verificamos la calidad e integridad del RNA purificado. Este paso es fundamental en el contexto de expresión génica y en la tecnología de microarreglos. La separación por electroforesis permite, a través del marcaje con BrEt, observar en el gel de agarosa 2 bandas que son indicador de integridad, estas corresponden a las subunidades 28S y 18S del RNAr. Una relación 2:1 (28S:18S) de la intensidad entre estas bandas representan buena calidad de la muestra. También obtuvimos la absorbancia a 260 y 280 nm, lo que nos permite conocer tanto la concentración del RNA total, como la relación entre la concentración de proteínas y ácidos nucleicos, la cual es expresada como el cociente o *ratio* de absorbancias en las dos longitudes de onda mencionadas (cociente A260/A280), estos datos pueden ser observados en la figura 1.

### 6.2. Análisis de microarreglos

Los microarreglos permiten conocer cambios en la expresión de genes. Como resultado de este ensayo se obtuvieron 4 listas correspondientes al corte estadístico  $Z\text{-score} > |1.5|$ . Se analizaron 2 listas de genes *UP* y 2 listas de genes *DOWN*. En el caso de las listas *UP* hubo un número total de 251 y 322 genes, por otra parte las listas *DOWN* agrupan 379 y 365 genes respectivamente. A partir de la comparación de las dos listas *UP* y *DOWN* resultaron 2 subgrupos cuyo cambio en el nivel de expresión fue consistente en ambos experimentos. El primer subgrupo corresponde a 18 genes *UP* en listados en la Tabla 2.

Tabla 1. Niveles de glucosa inicial y final de ratas control CN (vehículo), así como de ratas tratadas (STZ) dosis única 65 mg/ kg IP.

Rata	CN 1	STZ 1	CN 2	STZ 2
Glucosa inicial (mg/dl)	83	85	83	85
Glucosa final > 72 h (mg/dl)	85	381	88	559

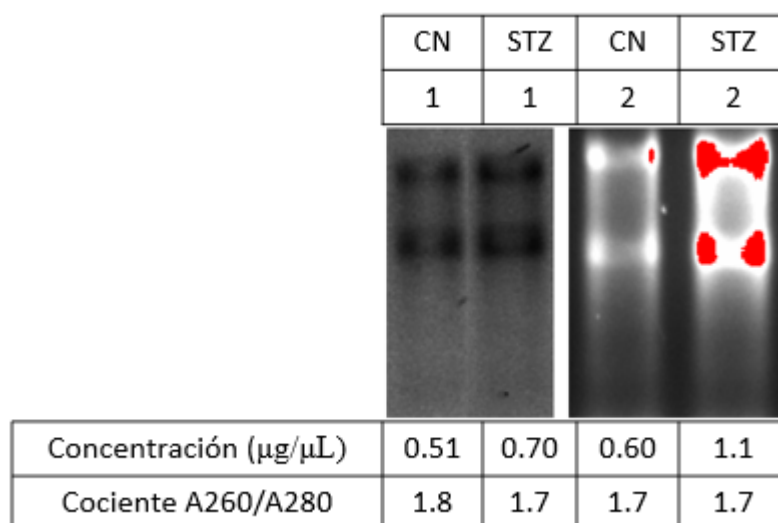


Figura 1. Geles de agarosa al 1%, teñido con Bromuro de Etidio (BrEt), muestras de RNA control (CN), Estreptozotocina (STZ), separadas por electroforesis, con estas muestras se hibridaron los chips de microarreglos, se indica concentración y valores de cociente A260/A280.

Tabla 2. Lista de subgrupo de genes UP  $>|1.5|$  que aumentaron su expresión con respecto al control: abreviación, nombre completo de cada gen, número de identificación en el Genbank del NCBI y el promedio del (Z-score), Fórmula:  $Z_i = (R_i - \text{media}(R)) / \text{sd}(R)$ .

Abreviación	Genes UP	ID NCBI	z-score promedio
Ass	Argininosuccinate synthetase	M36708	1.71
Bet1	Golgi vesicular membrane trafficking protein	NM_019251	2.01
Cish	Cytokine-inducible SH2-containing protein	AF065161	1.93
Crybb1	Crystallin beta B1	NM_012936	1.81
Ctsd	Preprocathepsin D	X54467	2.24
Fxyd5	FXYP domain containing ion transport regulator 5 variant 1 Dysadherin	NM_021909	1,68
Gfer	Augmenter of liver regeneration	NM_013222	2.08
H1f4	Histone H1d	M31229	1.81
Hes3	Hes family bHLH transcription factor 3	NM_022687	1.57
Hist4	Histone cluster 1 H4 family member B	NM_022686	1.75

Hivep2	Human immunodeficiency virus type I enhancer binding protein 2	NM_024137	2.62
Jdp1	Basic leucine zipper ATF-like transcription factor 3 (Batf3)	NM_021865	2.2
LOC252831	Bartomin	NM_145722	1.86
Lhcgr	Luteinizing hormone/ choriogonadotropin receptor	NM_012978	2.51
Pde10a	Phosphodiesterase 10A	NM_022236	2.36
Scnn1b	mRNA for sodium channel, beta subunit	X77932	2.2
Wfs1	wolframin ER transmembrane glycoprotein(Wfs1)	NM_031823	2.24
Znf291	-----	AF347027	1.88

El segundo subgrupo corresponde a 26 genes *DOWN* (Tabla 3), en ambos casos se obtuvo un promedio de los valores de *Z-score* para cada gen, respectivo a cada experimento.

Debido a que los genes enlistados en las tablas 2 y 3 han sido reportados en distintas vías de señalización y patologías fue necesario seleccionar aquellos genes que de acuerdo con nuestra investigación bibliográfica se ven involucrados con el desarrollo o progresión de EA y neuropatías, dichos genes se encuentran en la Tabla 4. En la siguiente sección bosquejamos la función normal de las proteínas codificadas por los genes enlistados en la Tabla 4, y en la sección de Discusión nos enfocaremos en las evidencias que relacionan estos genes con las neuropatías y/o la EA.

### **6.3 Función de las proteínas susceptibles de regulación por la hiperglucemia**

La cinasa dependiente de ciclina 5 (Cdk5) es un miembro de la familia de cinasas de Ser/Thr dirigidas por prolina, es activada una vez que se une a p35 u otra subunidad llamada p39. La subunidad p35 también es conocida en la literatura como Cdk5r1, es de expresión ubicua y está compuesta por 307 aminoácidos, con una masa molar de 35 Kda (Monaco, 2004). La expresión de los mensajeros de Cdk5 y de p35/Cdk5r1 disminuyeron, respectivamente, -2.71 y -3.15 desviaciones estándar, en promedio, con respecto al control en nuestros experimentos de microarreglos.

El ácido gama aminobutírico (GABA) es el neurotransmisor inhibitorio predominante del cerebro de los vertebrados, actuando principalmente a través de receptores GABA tipo A (GABAA), estos pertenecen a una superfamilia de canales iónicos dependientes de ligandos hetero-oligoméricos que también incluye los receptores de glicina y nicotínicos de acetilcolina (Kim *et al.*, 1997); en nuestro experimento se observó una disminución de -1.6 desviaciones estándar con respecto al control de la subunidad Alpha 5 del receptor GABA<sub>A</sub> (GABRA5).

El factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) es una proteína perteneciente a la familia de las citocinas, con un peso molecular de 25 Kda, Está compuesta por dos monómeros de 12.5 Kda enlazados por un enlace disulfuro, se encarga de regular el crecimiento y la diferenciación celular, la respuesta a daño en tejido por inflamación,

Tabla 3. Lista de subgrupo de genes DOWN  $>|1.5|$  que disminuyeron su expresión con respecto al control: abreviación, nombre completo de cada gen, número de identificación en el Genbank del NCBI y el promedio del Z-score, Fórmula:  $Z_i = (R_i - \text{media}(R)) / \text{sd}(R)$ .

Abreviación	Genes <i>DOWN</i>	ID NCBI	Z-score promedio
Atp5a1	H <sup>+</sup> -ATPase	J05266.1	-4.1
Bin1	Amphiphysin	Y13380	-2.05
Cdk5/Cdk5r1	Cdc2-related protein kinase	L02121	-2.71/-3.15
Dcx	Doublecortin	AF155959	-1.96
Dlad	Deoxyribonuclease 2 beta	NM_021664.1	-2.13
Fgfr2	Fibroblast growth factor receptor 2	L19104.1	-1.77
Gabra5	GABA Receptor A 5	X51992.1	-1,6
Ggtb2	N-acetylglucosamine galactosyltransferase	AF102262.1	-2.67
Grm1	Glutamate metabotropic receptor 1 (mGlu1)	NM_017011.1	-2.42
Hmgcl	HMG-CoA lyase	NM_024386	-1,54

Klk1	Kallikrein 1	NM_012593	-2.07
Lap1c	Lamina associated polypeptide 1C	U20286	-1.84
LOC246234 (Slc34a3)	Solute carrier family 34 member 3	NM_139338	-1.97
Nadrin	Nadrin E1	AB060556	-1.64
Plid1	Phospholipase D1	U69550	-2.48
Psmc2	Proteasomal ATPase	D50694	-2.87
Rtp801	DNA-damage-inducible transcript 4 (Ddit4)	NM_080906	-1.78
Sep15-pending	Selenoprotein F	NM_133297	-2.34
Slc7a7	Carrier family 7 member 7 (Slc7a7)	NM_031341	-1.83
Smgb	SMGB1/SMGB2	M83210	-1.64
Tgfb2	Transforming growth factor, beta 2 (TGF-b2)	NM_031131	-2.37
Thrsp	Rat hepatic product spot 14	K01934	-2.44
Timp2	Tissue inhibitor of metalloproteinase type 2	AJ409332	-2.04



Vdup1	Rattus norvegicus clone N27	U30789	-2.41
Vmp1	Vacuole membrane protein 1	NM_138839	-3.3
YT521	RNA splicing-related protein	D78303	-1,8

Tabla 4. Lista de genes que están involucrados en el desarrollo, progresión o que brindan efectos protectores contra EA y neuropatías, se la enlista la abreviación, nombre completo, promedio de Z-score, patología con la cual se relaciona.

Abreviación	Gen	Z-score promedio	Patologías
Cdk5/Cdk5r1	Cdc2-related protein kinase	-2.71/ -3.15	EA
GABRA5	GABA Receptor $\alpha$ 5	-1,6	EA
TGF- $\beta$ 2	Transforming growth factor, subunit beta 2 (TGF- $\beta$ 2)	-2.37	EA
Grm1	Glutamate metabotropic receptor 1 (mGlu1)	-2.42	Neuropatía diabética
Timp2	Tissue inhibitor of metalloproteinase type 2	-2.04	Miocardopatía diabética

y también juega un papel importante en la reparación de tejidos después de una lesión (Heldin y Moustakas, 2016). Se observó una disminución de -2.71 desviaciones estándar en la expresión del mensajero en condiciones de hiperglucemia después de obtener el promedio de valores de ambos microarreglos.

Los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) se clasifican en tres subgrupos (I, II y III) basados en homología de secuencia, señalización, vías de transducción y farmacología relativa. El grupo I comprende mGluR1 y mGluR5 (Mahato *et al.*, 2018). En nuestros resultados de microarreglos de tejido nervioso en condiciones de hiperglucemia sostenida se observó una disminución promedio de la expresión de este mensajero de -2.42 desviaciones estándar.

Los inhibidores tisulares de la proteinasa conocidos como TIMP (1-4) son inhibidores de las metaloproteinasas de matriz (MMP); TIMP se compone de dos dominios, un N-terminal de 125 aminoácidos y un dominio C-terminal más pequeño de 65 residuos, cada dominio está estabilizado por tres enlaces disulfuro (Visse, 2003). En tejido nervioso en condiciones de hiperglucemia disminuyó la expresión del mensajero -2.04 desviaciones estándar en promedio.

## 7. DISCUSION

### 7.1. Genes involucrados en la EA

#### CDK5

En la EA ocurren eventos de excitotoxicidad, donde la activación de receptores para glutamato tipo NMDA y AMPA, así como canales de calcio activados por voltaje pueden provocar aumento en la concentración del calcio intracelular y pueden llevar a la activación de las calpaínas (Hasanbasic *et al.*, 2016). A su vez, las calpaínas proteolisan a p35/Cdk5r1, formando 2 subunidades más pequeñas llamadas p10 y p25. El complejo formado por CDK5/p25 promueve la muerte celular. En contraste, el complejo formado por Cdk5/p35 (Cdk5r1) está involucrado en procesos neuro protectores (Shi *et al.*, 2016).

En nuestro experimento en condiciones de hiperglucemia se observó una disminución de la expresión de Cdk5 y p35/Cdk5r. Se ha reportado que la disminución de la expresión de Cdk5 revierte la hiperfosforilación de tau en cultivos neuronales primarios y disminuye el número de ovillos neurofibrilares en el hipocampo de ratones transgénicos con EA (Piedrahita *et al.*, 2010), lo cual podría estar relacionado con actividad neuro protectora frente a la EA. Por otro lado, p35 está vinculado con proliferación, diferenciación y maduración de células madre neurales (Quan *et al.*, 2014) por lo que la disminución de la expresión de este mensajero puede repercutir en procesos de neuroregeneración.

Interesantemente, ratones knock out que carecen de expresión de Cdk5, predominantemente en neuronas de fibra tipo C, presentan hipoalgesia en respuesta a la activación térmica (Liu *et al.*, 2015). Este dato sugiere que la disminución de la expresión del mensajero para Cdk5 en condiciones de hiperglucemia también podría contribuir al desarrollo de neuropatías y pérdida de sensación en condiciones de DM.

Shi y colaboradores (2016) observaron que cuando se activa Cdk5, puede regular la eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS) a través de la activación por fosforilación directa del factor de transcripción FOXO3 en células HT22 estresadas con glutamato, pero al mismo tiempo promueve la proteólisis que vuelve neurotóxica

a la variación del péptido  $\beta$ -amiloide (1-42), característica distintiva de la EA. En nuestros resultados se observó la disminución en la expresión del mensajero de Cdk5 en hiperglucemia, esto nos hace pensar que la disminución de la expresión de esta cinasa podría estar vinculada con el aumento de niveles de glucosa y a su vez la disminución con el aumento de las ROS.

## GABRA5

Se ha reportado la expresión de GABRA5 en varias zonas del cerebro humano, pero su expresión varía en las diferentes regiones. Por ejemplo, es abundante en hipocampo y es escasa en cerebelo, polo occipital, cuerpo calloso y sustancia negra (Kim *et al.*, 1997). Así mismo, mediante clonación molecular, se ha reportado la expresión de ésta y otras subunidades en distintas especies, entre ellas rata y ratón (Macdonald y Olsen, 1994; Tyndale *et al.*, 1994). La presencia del mensajero y su expresión en SNC concuerda con lo visto en nuestros resultados.

Hokama y colaboradores (2013), mediante la tecnología de microarreglos, obtuvieron 17 perfiles de expresión de hipocampo de donadores adultos, incluyendo 7 pacientes confirmados con EA; de ellos 16 cerebros presentaban placas neuríticas mientras que los ovillos neurofibrilares se encontraban en etapa de Braak V y VI, lo cual significa que tienen amplia distribución en zonas neocorticales. Este equipo de investigadores analizó un grupo de 1,387 transcritos, de los cuales seleccionaron 200 que presentaban  $>1.5$  veces de cambio, sorprendentemente 143 de estos 200 transcritos redujeron su expresión, entre éstos se encontraba GABRA5. Por otro lado, Li y colaboradores (2016) analizaron 10 perfiles de expresión obtenidos de la base de datos GEO NCBI de cerebros con EA, hallando disminución de la expresión de GABRA5 principalmente en lóbulo frontal, temporal e hipocampo.

La expresión de este receptor influye en procesos cognitivos como el aprendizaje y memoria (Borin *et al.*, 2007; Papatheodoropoulos y Koniaris, 2011). Curiosamente, se ha demostrado que la delección genética o inhibición farmacológica reduce notablemente el umbral para inducción de potenciación a largo plazo a través de la inhibición sináptica independiente, con un mejor rendimiento de la memoria como resultado (Saab *et al.*, 2010; Martin *et al.*, 2010). Sin embargo, como mencionamos

en el párrafo anterior, esta subunidad se encuentra disminuida en pacientes con EA.

En nuestro experimento, la hiperglucemia indujo una reducción de la expresión de este mismo receptor, lo cual sugiere que este mensajero es regulado en condiciones de hiperglucemia y en la EA, estos datos sugieren que puede estar involucrado en procesos neurodegenerativos.

## TGF- $\beta$ 2

Se ha observado que TGF- $\beta$  se une al precursor péptido amiloide (APP) reduciendo la disponibilidad del constituyente neurotóxico (Bodmer *et al.*, 1990)

Notablemente, Chao y colaboradores (1994) reportaron un aumento en el nivel de TGF-  $\beta$ 2 en muestras de fluido cerebroespinal y suero obtenidas de donadores con EA; también encontraron que estos niveles se veían elevados previo a la defunción. Estos investigadores, sugieren que este factor confiere actividad neuro protectora frente a enfermedades neurodegenerativas, entre ellas la esclerosis.

Por otra parte, mediante técnicas inmunohistoquímicas se ha comprobado la expresión de TGF- $\beta$ 2 en ovillos neurofibrilares neuronales, placas neuríticas, microglía, astrocitos y macrófagos en casos de EA, sugiriendo el papel de esta citocina en el desarrollo de lesiones (Peress y Perillo, 1995).

Flanders y colaboradores en 1995 hallaron mediante técnicas inmunohistoquímicas usando muestras de tejidos de pacientes que presentaban EA no heredada y EA hereditaria autosómica dominante, que la expresión de TGF- $\beta$ 2 aumentó 3.2 veces en comparación con el control. En nuestros experimentos en condiciones de hiperglucemia se observó una disminución de la expresión de este factor de crecimiento, estos datos sugieren que hiperglucemia disminuye el efecto neuro protector del TGF- $\beta$ 2 en SNC, favoreciendo el desarrollo de placas amiloides y la progresión de la EA.

## 7.2. Genes involucrados en neuropatías

### mGluR1

Tomiyama y colaboradores (2005) disectaron el segmento lumbar L4 de ratas diabéticas inducidas con STZ y usaron sondas de oligonucleótidos para identificar hibridación *in situ* en mRNA de receptores glutamatérgicos. Encontraron que la expresión de mGluR1 y mGluR5 (grupo I) aumentó en el núcleo postero marginal, sustancia gelatinosa de Rolando, núcleo propio y en el cuello de la asta posterior de la asta dorsal. Se ha visto que la estimulación continua anormal de los receptores de glutamato en las neuronas de la asta dorsal causa hiperalgesia y alodinia por un proceso llamado sensibilización central (Gerber *et al.*, 2000), lo que sugiere que el aumento en la expresión de mGluR1 se ve implicado en el desarrollo de neuropatías diabéticas. En nuestro experimento la disminución del mensajero del receptor de glutamato de -2.71 desviaciones estándar sugiere que puede constituir un mecanismo protector. Si bien el experimento que se discute es realizado en SNP también este receptor se ha visto involucrado en condiciones de isquemia cerebral, además, se ha reportado que los antagonistas de mGluR1 son neuro protectores en modelos de isquemia cerebral (Pellegrini-Giampietro, 2003), por lo que puede desempeñar funciones protectoras en SNC.

### TIMP-2

Con respecto al inhibidor de metaloproteasas TIMP2, encontramos que Quian y colaboradores (2007) mostraron aumento significativo en su expresión, acompañado de una reducción de la actividad de metaloproteasas en tejido cardíaco de ratas diabéticas en un modelo de hiperglucemia sostenida por 4 semanas, inducido por una dosis única de STZ (60 mg/kg). Estos investigadores sugieren que el incremento en el inhibidor y la reducción de la actividad de metaloproteasas lleva a un desacople de la degradación de colágena, lo que puede contribuir al desarrollo de cardiopatías diabéticas.

Por otro lado, Perez-Martinez y Jaworski (2005) reportaron que TIMP-2 induce la detención del ciclo celular en células PC12, mediante la regulación de proteínas involucradas en este proceso, lo que promueve su diferenciación y crecimiento de

neuritas. La delección de este inhibidor induce una reducción de la longitud de filamentos intermedios. Además, la interacción de TIMP-2 con la integrina  $\alpha3\beta1$  mantiene la quiescencia mitótica a través de la activación de esta integrina, lo cual puede influir de manera significativa en la capacidad del cerebro para generar nuevas neuronas en respuesta a lesiones y trastornos neurológicos como la EA. Todo esto de manera independiente a su actividad como inhibidor de metaloproteasas.

En nuestro experimento en SNC en condiciones de hiperglucemia se observó una disminución de la expresión de TIMP-2 de -2.04 desviaciones estándar, lo cual podría sugerir que alteraciones en niveles de glucosa modulan la expresión de este mensajero de manera distinta dependiendo el tejido, por lo que podría comprometer la estructura dendrítica y la formación de nuevas sinapsis, aunque tal vez también se promovería la generación de nuevas neuronas.



## 8. CONCLUSIONES

1.- La hiperglucemia produjo cambios en la expresión de RNA mensajeros en SNC que han sido involucrados previamente en el desarrollo de la EA y neuropatías.

2.- La disminución de la expresión de CDK5 inducida por la hiperglucemia puede ser parte de un mecanismo de neuroprotección, ya que se ha reportado que revierte la hiperfosforilación de tau en cultivos neuronales primarios y disminuye el número de ovillos neurofibrilares en el hipocampo de ratones transgénicos con EA. Por otro lado, la disminución de P35 sería más relevante en embiones expuestos a altas concentraciones de glucosa, porque podría comprometer la maduración del SNC, sin embargo, su papel en DM invita a una mayor exploración de su papel en neuronas maduras.

3.- El mensajero de GABRA5 redujo su expresión y se ha reportado este mismo patrón de expresión en cerebros con EA, lo cual sugiere que este mensajero juega un papel importante en el desarrollo o progresión de esta demencia. Por otro lado, se ha reportado un aumento de la expresión de TGF- $\beta$ 2 en ovillos neurofibrilares y placas neuríticas, por lo que la disminución de la expresión de este último mensajero resultaría en el bloqueo de este mecanismo de neuroprotección.

4.- El aumento de la expresión de mGlu1 ha sido vinculada al desarrollo de neuropatías, sin embargo, la disminución de este mensajero en este trabajo sugiere un papel de protección frente a esta patología.

5.- Finalmente, en nuestro modelo la expresión de TIMP-2 disminuyó en SNC, en contraste con lo observado en tejido cardiaco, lo que sugiere que su expresión es modificada de manera distinta dependiendo el tejido condiciones de hiperglucemia. La disminución de TIMP-2 podría comprometer la formación y mantenimiento de dendritas y sinapsis, afectado así la memoria y el aprendizaje.

## **9. PERSPECTIVAS**

Nuestro proyecto y resultados abren vías de investigación que permitirán aportar datos más concluyentes al efecto de la hiperglucemia en tejido nervioso a nivel de DNA y proteína, por ello sugerimos lo siguiente:

- 1.- Diseño de oligonucleótidos para amplificar por PCR en tiempo real los genes asociados a EA y neuropatías, y confirmar su modulación en condiciones de hiperglucemia
- 2.- Verificar si los mensajeros de dicha lista sufren cambios a nivel proteínico por Western Blot.
- 3.- Usar modelos de neuroblastoma para determinar los efectos de la reducción de mRNAs en la supervivencia neuronal (p.ej GABRA5) y o la formación de neuritas(TIMP2).

## 10. REFERENCIAS

- American Diabetes Association. (2019). *Diabetes Care* 2019 Jan; 42(Supplement 1): S4-S6.
- Bennett, D. A., Schneider, J. A., Wilson, R. S., Bienias, J. L., Arnold, S. E. (2004). Neurofibrillary Tangles Mediate the Association of Amyloid Load With Clinical Alzheimer Disease and Level of Cognitive Function. *Archives of Neurology*, 61(3), 378.
- Beeri, M. (2011). Serum concentration of an inflammatory glyco- toxin, methylglyoxal, is associated with increased cognitive decline in elderly individuals. *Mech. Ageing Dev.* 132, 583–587.
- Bodmer, S., Podlisny, M., Selkoe, D., Heid, I., Fontana, A. (1990). Transforming growth factor-beta bound to soluble derivatives of the beta amyloid precursor protein of Alzheimer's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 171(2), 890–897.
- Bonin, RP., Martin, LJ., MacDonald, JF., Orser BA. (2007). Alpha5GABAA receptors regulate the intrinsic excitability of mouse hippocampal pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 98, 2244-2254.
- Boulton, A. J. M., Vinik, A. I., Arezzo, J. C., Bril, V., Feldman, E. L., Freeman, R., Malyk, R., Maser, R., Sosenko, J., Ziegler, D. (2005). Diabetic Neuropathies: A statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care*, 28, 956–962.
- Cashman, C., Höke, A. (2015). Mechanisms of distal axonal degeneration in peripheral neuropathies. *Neuroscience Letters*, 596, 33–50.
- Chao, C., Hu, S., Frey, W., Ala, T., Tourtellotte, W., Peterson, P. (1994). Transforming growth factor beta in Alzheimer's disease. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 1(1), 109-110.
- Charles, A., Landsman, P., Teutsch, S., Haffner, S. (2003). NCEP-Defined Metabolic Syndrome, Diabetes, and Prevalence of Coronary Heart Disease Among NHANES III Participants Age 50 Years and Older. *Diabetes*, 52(5), 1210–1214.
- Conley, N. R., Biteen, J. S., Moerner, W. E. (2008). Cy3-Cy5 Covalent Heterodimers for Single-Molecule Photoswitching. *J of Phys Chem*, 112(38), 11878–11880.

- Deane R. (2003). RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat Med*, 9, 907–913.
- Diario Oficial de la Federación. (2010). NORMA Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus
- Dyck, P., Karnes, J., O'Brien P. (1986). The spatial distribution of fiber loss in diabetic polyneuropathy suggests ischemia. *Ann Neurol* 19, 440–449.
- Dyck, P., Albers, J., Andersen, H. (2011). Toronto Expert Panel on Diabetic Neuropathy. Diabetic polyneuropathies: update on research definition, diagnostic criteria and estimation of severity. *Diabetes Metab Res Rev*.
- Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT). (2012) Disponible en:

<https://ensanut.insp.mx/doctos/analiticos/DiabetesMellitus.pdf>

- Engerman, R., Bloodworth, J., Nelson, S. (1977). Relationship of Microvascular Disease in Diabetes to Metabolic Control. *Diabetes*, 26(8), 760–769.
- Erol, A. (2008). An integrated and unifying hypothesis for the metabolic basis of sporadic Alzheimer disease. *J Alzheimer Dis*, 13, 241-53.
- Flanders, K., Lippa, C., Smith, T., Pollen, D., Sporn, M. (1995). Altered expression of transforming growth factor-beta in Alzheimer's disease. *Neurology*, 45(8), 1561–1569.
- Gabbay, K., Merola, L., Field, R. (1966). Sorbitol Pathway: Presence in Nerve and Cord with Substrate Accumulation in Diabetes. *Science*, 151(3707), 209–210.
- Gasparini, L., Gouras, G., Wang, R., Gross, R., Beal, M., Greengard, P. (2001). Stimulation of beta-amyloid precursor protein trafficking by insulin reduces intraneural beta-amyloid and requires mitogen-activated protein kinase signaling, *J Neurosci*, 21, 2561–2570.
- Gasparini, L., Netzer, W., Greengard, P., Xu, H. (2002). Does insulin dysfunction play a role in Alzheimer's disease? *Trends Pharmacol Sci*, 23, 288–293.
- Gerber, G., Youn, D., Hsu, C., Isaev, D., Randić, M. (2000). Spinal dorsal horn synaptic plasticity: involvement of Group I metabotropic glutamate receptors. *Nervous System Plasticity and Chronic Pain*, 115–134.

- Gómez-Mayén, A.P., Corral-Guillé, G., Riego- Ruíz, L., Coello- Coutiño, G. (2006). The genArise Package. pp 1-32.
- Gray, E.J., Gardner, T.W. (2015) Retinal Failure in Diabetes: a Feature of Retinal Sensory Neuropathy. *Current Diab Rep*, 15, 107.
- Hasanbasic, S., Jahic, A., Karahmet, E., Sejranic, A., Prnjavorac, B. (2016). The rol of cysteine protease in alzheimer disease. *Mater Sociomed*, 28(3), 235-238.
- Hodges, LM., Fyer, AJ., Weissman, MM., Logue, MW., Haghghi, F., Evgrafov, O., Rotondo, A., Knowles, JA., Hamilton, SP. (2014). Evidence for linkage and association of GABRB3 and GABRA5 to panic disorder. *Neuropsychopharmacology* 39, 2423-2431.
- Hokama, M., Oka, S., Leon, J., Ninomiya, T., Honda, H., Sasaki, K., Iwaki, T., Ohara, T., Sasaki, T., LaFerla, F., Kiyohara, Y. (2013). Altered expression of diabetes-related genes in Alzheimer's disease brains: the Hisayama study. *Cerebral Cortex*, 24(9), 2476-2488.
- Hoyer, S. (1998). Is sporadic Alzheimer disease the brain type of noninsulin dependent diabetes mellitus? A challenging hypothesis. *J Neural Transm*, 105, 415–422.
- Hoyer, S. (2002). The aging brain. Changes in the neuronal insulin/ insulin receptor signal transduction cascade trigger lateonset sporadic Alzheimer disease (SAD). A mini review. *J Neural Transm*, 109, 991–1002.
- Kawai, H., Nakai, H., Suga, M., Yuki, S., Watanabe, T., Saito, K.I. (1997). Effects of a novel free radical scavenger, MCI-186, on ischemic braindamage in the rat distal middle cerebral artery occlusion model. *J. Pharmacol.* 281, 921–927.
- Kim, Y., Glatt, H., Xie, W., Sinnett, D., Lalande, M. (1997). Human  $\gamma$ -Aminobutyric Acid-Type A Receptor  $\alpha 5$  Subunit Gene (GABRA5): Characterization and Structural Organization of the 5' Flanking Region. *Genomics*, 42(3), 378–387.
- Knopman, D., Boland, L. L., Mosley, T., Howard, G., Liao, D., Szklo, M., Folsom, A. (2001). Cardiovascular risk factors and cognitive decline in middle-aged adults. *Neurology*, 56(1), 42–48.

- Li, WX., Dai, SX., Liu, Q., Wang, Q., Li, H., & Huang, JF. (2016). Integrated Analysis of Alzheimer's Disease and Schizophrenia Dataset Revealed Different Expression Pattern in Learning and Memory. *Journal of Alzheimer's Disease*, 51(2), 417–425.
- Liu, S., Wang, C., Jiang, T., Tan, L., Xing, A., Yu, J. (2015). The Role of Cdk5 in Alzheimer's Disease. *Molecular Neurobiology*, 53(7), 4328–4342.
- Macdonald, R., Olsen, R. (1994). GABAA receptor channels. *Annu. Rev. Neurosci.* 17, 569–602.
- Martin, LJ., Zurek, AA., MacDonald, JF., Roder, JC., Jackson, MF., Orser, BA. (2010). Alpha5GABAA receptor activity sets the threshold for long-term potentiation and constrains hippocampus-dependent memory. *J Neurosci* 30, 5269- 5282.
- Meugnier, E., Faraj, M., Rome, S., Beauregard, G., Michaut, A., Pelloux, V., Louis- Chiasson, J., Laville, M., Clement, K., Vidal, H., Rabasa-Lhoret, R. (2007). Acute Hyperglycemia Induces a Global Downregulation of Gene Expression in Adipose Tissue and Skeletal Muscle of Healthy Subjects. *Diabetes*, 56(4), 992–999.
- Mirnics, K., Pevsner, J. (2014). Progress in the use of microarrays technology to study the neurobiology of disease. *Nature neurosci*, 7(5), 434-439.
- Moreira, P., Honda, K., Zhu, X., Nunomora, A., Casadesus, G., Smith, M., Perry, G. (2006). Brain and brawn: parallels in oxidative strength. *Neurology*, 66, 97–101.
- Muc, R., Saracen, A., Grabska-Liberek, I. (2018). Associations of diabetic retinopathy with retinal neurodegeneration on the background of diabetes mellitus. Overview of recent medical studies with an assessment of the impact on healthcare systems. *Open Medicine*, 13(1), 130–136.
- Münch, G., Schinzel, R., Loske, C., Wong, A., Durany, N., Li, J., Vlassara, H., Smith, M., Perry, G., Riederer, P. (1997). Alzheimer's disease-synergistic effects of glucose deficit, oxidative stress and advanced glycation endproducts. *J Neural Transm*, 105.
- Nadler, S., Stoehr, J., Schueler, K., Tanimoto, G., Yandell, B., Attie, A. (2000). The expression of adipogenic genes is decreased in obesity and diabetes

mellitus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 11371–11376.

- Nukada, H. (1992). Mild ischemia causes severe pathological changes in experimental diabetic nerve. *Muscle & Nerve*, 15(10), 1116–1122.
- Nukada, H. (2014). Ischemia and diabetic neuropathy. *Handbook of Clinical Neurology*, 469–487.
- Papatheodoropoulos, C., Koniaris, E. (2011). Alpha5GABAA receptors regulate hippocampal sharp wave-ripple activity in vitro. *Neuropharmacology* 60, 662-673.
- Pellegrini-Giampietro, E. (2003). The distinct role of mGlu1 receptors in post-ischemic neuronal death. *Trends in Pharmacological Sciences*, 24(9), 461–470.
- Peress, N., Perillo, E. (1995). Differential expression of TGF- $\beta$ 1, 2 and 3 isoforms in Alzheimer's disease: A comparative immunohistochemical study with cerebral infarction, aged human and mouse control brains. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 54(6), 802-811.
- Perez-Martinez, L., Jaworski, D. (2005). Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2 Promotes Neuronal Differentiation by Acting as an Anti-Mitogenic Signal. *Journal of Neuroscience*, 25(20), 4917–4929.
- Piedrahita, D., Hernandez, I. (2010). Silencing of CDK5 reduces neurofibrillary tangles in transgenic Alzheimer's mice. *J Neurosci*, 30(42), 13966–13976.
- Polonsky, K. (2012). The past 200 years in diabetes. *N Engl J Med*, 367, 1332- 1340.
- Qian, H., Wu, X., Tian, Y., Wang, Y., Li, C., y Li, H. (2014). Overexpression of CDK5 in Neural Stem Cells Facilitates Maturation of Embryonic Neurocytes Derived from Rats In Vitro. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 69(3), 445–453.
- Qian, Li,. Shu-zhen, Sun,. Yi, Wang,. Yong-jie, Tian., Ming-hua, Liu. (2007). The roles of MMP-2/TIMP-2 in extracellular matrix remodelling in the hearts of STZ-induced diabetic rats, *Acta Cardiologica*, 62(5), 485-491
- Rachana, K., Mallahalli, M., Gopal, A. (2016). Insulin influenced expression of myelin proteins in diabetic peripheral neuropathy. *Neuroscience Letters*, 629.
- Román, G. (2005). Vascular dementia prevention: a risk factor analysis. *Cerebrovasc Dis*, 20, 91-100.

- Russell, J., Zilliox, L. (2014). Diabetic Neuropathies. *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*, 20, 1226–1240.
- Saab, BJ., MacLean, AJB., Kanisek, M., Zurek, AA., Martin, LJ., Order, JC., Orser, BA. (2010). Short-term memory impairment after isoflurane in mice is prevented by the alpha 5 gamma-aminobutyric acid type A receptor inverse agonist L-655,708. *Anesthesiology* 113, 1061-1071.
- Shi, C., Viccaro, K., Lee, H., Shah, K. (2016). Cdk5–Foxo3 axis: initially neuroprotective, eventually neurodegenerative in Alzheimer’s disease models. *Journal of Cell Science*, 129(9), 1815–1830.
- Smith, A., Russell, J., Feldman, E., Goldstein, J., Peltier, A., Smith, S., Hamwi, J., pollari, D., Bixby, B., Howard, J., Singleton, J. (2006). Lifestyle intervention for pre-diabetic neuropathy. *Diabetes care*, 29(6), 1294-1299.
- Spallone, V., Ziegler, D., Freeman, R. (2011). Toronto Consensus Panel on Diabetic Neuropathy. Cardiovascular autonomic neuropathy in diabetes: clinical impact, assessment, diagnosis, and management Diabetes. *Metab Res Rev*.
- Taylor, R., Agius, L. (1988). The biochemistry of diabetes. *J Biochem*, 250, 625-640.
- Tesfaye, S., Boulton, A. J. M., Dyck, P. J., Freeman, R., Horowitz, M., Kempler, P. (2010). Diabetic Neuropathies: Update on Definitions, Diagnostic Criteria, Estimation of Severity, and Treatments. *Diabetes Care*, 33(10), 2285–2293.
- Thomas, P. (1997). Classification, Differential Diagnosis, and Staging of Diabetic Peripheral Neuropathy. *Diabetes*, 46, 54–57.
- Tomiyama, M., Furusawa, K., Kamijo, M., Kimura, T., Matsunaga, M., Baba, M. 2005. Upregulation of mRNAs coding for AMPA and NMDA receptor subunits and metabotropic glutamate receptors in the dorsal horn of the spinal cord in a rat model of diabetes mellitus. *Molecular Brain Research*, 136(1), 275–281.
- Tyndale, R., Olsen, R. W., Tobin, A. (1994). Handbook of Receptors and Channels: Ligand and Voltage-Gated Ion Channels. *CRC Press*, Boca Raton, FL.



- Van Deutekom, A. (2008). Increased Nepsilon-(carboxymethyl)- lysine levels in cerebral blood vessels of diabetic patients and in a (streptozotocin-treated) rat model of diabetes mellitus. *Eur. J Endocrinol*, 158(5), 655–660.
- Villalpando S., Shamah-Levy, T., Rojas, R., Aguilar-Salinas, C. (2010). Trends for type 2 diabetes and another cardiovascular risk factors in Mexico from 1993–2006. *Salud Pub Mex*, 52(1), 72-79.
- Watson, G., Craft, S. (2006). Insulin resistance, inflammation, and cognition in Alzheimer's disease. Lessons for multiple sclerosis, *J Neurol Sci*, 245, 21–33.
- Yorek, M., Dunlap, J., Ginsberg, B. (1987). Myo-Inositol metabolism in 41A3 neuroblastoma cells: effects of high glucose and sorbitol levels, *J Neurochem*, 48, 53–61.
- Zilliox, L., Russell, J. (2011). Treatment of Diabetic Sensory Polyneuropathy. *Current Treatment Options in Neurology*, 13(2), 143–159.