



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Facultad de Estudios Superiores Iztacala**

**EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON ALL-TRANS ÁCIDO RETINOICO SOBRE LOS  
NIVELES DEL FACTOR DE CRECIMIENTO NEURAL Y DESARROLLO DE LA  
NEUROPATÍA DIABÉTICA EN RATONES**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I Ó L O G O**

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

**NORMA YANET HERNÁNDEZ PEDRO**



Director de Tesis:

**DR. OSCAR G. ARRIETA RODRÍGUEZ.**

Los Reyes Iztacala

2007



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.

## **DEDICATORIA**

Le quiero dedicar este trabajo a Yare por haber llegado en un momento crítico de mi vida y hacerme ver que las cosas difíciles siempre tienen solución.

A mis padres Sera y Carlos, ya que gracias a ellos logre concluir un proyecto más en mi vida

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi Familia por haberme apoyado en las buenas y en las malas durante todo este tiempo, y por confiar en que puedo lograr muchas cosas.

A mis hermanitas Claudia y Yare por influir en las decisiones importantes.

A mis amigos, en especial a Carmen, Guille, Rafa con quienes he convivido y me han apoyado durante una gran parte de mi vida.

A todos los de Neurología y en especial a Benjí por los consejos y todo su apoyo en la realización de este trabajo.

A mis nuevos amigos del INCAN, Diana, Abril, Daniela y Tania, en donde termine mi tesis.

A Oscar por brindarme la oportunidad de trabajar con él y desviar mi camino hacia algo mejor.

A Toch, Fela, Yiyo, Javi, Paty, Juanis, Elias y mis compañeros de la FESI



# ÍNDICE

	PAGINA
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	5
OBJETIVOS	17
HIPÓTESIS	18
METODOLOGÍA	19
RESULTADOS	23
DISCUSIÓN	25
CONCLUSIÓN	26
BIBLIOGRAFÍA	27
FIGURAS	33



## RESUMEN

Disminución en la síntesis del factor de crecimiento neural (NGF) contribuye a la aparición de la neuropatía diabética, incluido pacientes y modelos animales. El all-trans ácido retinoico (AR) incrementa la expresión del factor de crecimiento y su receptor, y participa en la traducción de vías de señalización. Este estudio evaluó el tratamiento con AR en la neuropatía diabética.

Se utilizaron 120 ratones, los cuales fueron separados en 4 grupos. El grupo A (n=30) fue considerado como control; el grupo B (n=30) recibió estreptozotocina (STZ) para inducir diabetes mellitus; el grupo C (n=30) recibió STZ y posterior al establecimiento de la neuropatía, recibió ácido retinoico (AR) y el grupo D (n=30) únicamente recibió AR. Las concentraciones de glucosa, el contenido de factor de crecimiento neural (NGF) en nervio y en suero y la prueba termosensible fueron realizados en todos los animales, fue realizada microscopía electrónica en nervio ciático con el propósito de evaluar cambios morfológicos debidos a la neuropatía.

Todos los ratones diabéticos (grupo B y C) presentaron incremento en el umbral de dolor después del tratamiento con el vehículo para AR. La administración de AR revierte los cambios de sensibilidad en ratones diabéticos. No se encontraron diferencias en umbral de dolor en los ratones control, ácido retinoico (AR) y diabetes mellitus (DM) más AR al final del estudio. Los niveles de glucosa no fueron afectados posteriormente al tratamiento con AR. Los contenidos de NGF disminuyeron significativamente en nervio ciático en el grupo B (diabetes mellitus sin tratamiento) cuando se comparan con el grupo A (control), y grupo D (AR

control), adicionalmente, el grupo C (diabetes tratado con AR) tuvo un incremento significativo en el contenido de factor de crecimiento neural en nervio ciático cuando se compara con todos los grupos. El AR también revirtió los cambios ultraestructurales inducidos por diabetes incrementando la regeneración neural.

El AR revierte la sensibilidad y los cambios ultraestructurales de la neuropatía diabética previamente establecida posiblemente al incrementar las concentraciones de NGF nervio ciático en ratones.

## INTRODUCCIÓN

La Diabetes Mellitus (DM) figura como una de las diez primeras causas de muerte en el mundo y afecta aproximadamente al 6% de la población mundial; la DM es una de las principales causas de la morbilidad y defunción en México; la mortalidad por este padecimiento ha mostrado una tendencia ascendente (Escobedo-De la Peña 1993, Vázquez-Robles 1990). A su vez, la población mexicana tiene una de las prevalencias más altas de DM, la cual ha tenido un incremento en los últimos años, probablemente como consecuencia de una mayor ocurrencia del padecimiento (Vázquez-Robles 1993).

Esta enfermedad se clasifica en dos tipos de acuerdo con su patogénesis: la tipo 1 representa menos del 10 % del total de los pacientes, y su característica fundamental es la ausencia de insulina, causada predominantemente por la destrucción autoinmune de las células del páncreas, por lo que el tratamiento consiste en la administración de insulina en dosis adecuadas. Por otra parte, la DM tipo 2 es más común dentro de la población de pacientes diabéticos. Estos pacientes desarrollan fundamentalmente el fenómeno de resistencia a la insulina causada por cambios biológicos en las membranas celulares que no permiten una adecuada unión de la hormona a la célula diana, por lo cual son tratados generalmente con hipoglucemiantes orales. En la DM los niveles de glucosa sanguíneos aumentan, provocando alteraciones en 3 macromoléculas fundamentales del metabolismo: carbohidratos, lípidos y proteínas (The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus 1998).

El 80 % de los pacientes diabéticos tipo 2 mueren debido a complicaciones trombóticas, el 75 % de estas relacionadas con eventos cardiovasculares y el resto con enfermedades vasculares periféricas y cerebrovasculares (OMS y la Federación Internacional de Diabetes 2003).

En México, 60% de los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 presentan alguna forma de neuropatía diabética y su frecuencia depende de la duración de la diabetes y del descontrol metabólico, se estima que el 7% de los pacientes tiene neuropatía al momento del diagnóstico. La prevalencia aumenta 50% después de 25 años de evolución cuando se define con base en datos subjetivos y a 100% al utilizarse pruebas electrofisiológicas.

La neuropatía diabética es la complicación más común de la diabetes mellitus y es la mayor causa de morbilidad y mortalidad. Se define como los síntomas de un trastorno nervioso periférico, junto con signos anormales, reflejos aquíleos disminuidos o medidas objetivas anormales (alteración de los estudios de conducción nerviosa) (Pourmand 1997).

Debido a la evolución de la DM se pueden producir tres tipos de neuropatía diabética: en nervios sensitivos, autonómicos y/o motores. La primera se caracteriza por dolor en el pie y parestesias, así como pérdida de los reflejos aquíleos. El signo motor más frecuentes es la debilidad de los extensores de los dedos de los pies y de las piernas, en los casos más graves, la debilidad también afecta las manos. La neuropatía diabética autonómica es de comienzo insidiosa y

se manifiesta por hipertensión ortostática, impotencia, diarrea o estreñimiento, desinervación cardíaca y alteración de los reflejos fotomotores pupilares. La neuropatía motora de origen diabético, suele presentar un comienzo agudo, con afección del plexo lumbosacro, los nervios ciáticos, femorales, medianos y cubitales y el tercer y séptimo pares craneales (Guthrie et al 2004).

Entre los mecanismos fisiopatológicos de la neuropatía diabética destaca el proceso metabólico del aumento de la derivación de la glucosa por la vía de los políoles o aldosa-reductasa. Otros factores son, lesión oxidativa (aumento de radicales libres), lesiones estructurales específicas a nivel de la unidad funcional del nervio y disminución de la síntesis de factor de crecimiento neural, (NGF por sus siglas en inglés) principalmente.

Las alteraciones de la vía de los polioles consisten en convertir la glucosa en glucosa-6-fosfato por la enzima hexoquinasa. En presencia de un exceso de glucosa, se produce una saturación de la hexoquinasa, por lo cual, la enzima aldosa reductasa convierte la glucosa en sorbitol y posteriormente en fructosa por acción de la sorbitol deshidrogenasa. El incremento del sorbitol daña los tejidos que necesitan insulina y en otros cuyo contenido intracelular de glucosa es semejante al plasma como: córnea, retina, nervios periféricos, glomérulo renal y cerebro. La hiperglicemia y la acumulación del sorbitol intracelular producen depleción de mioinositol. El sorbitol y el mioinositol son miembros de una familia de osmolitos orgánicos intracelulares, cuya concentración es regulada en respuesta al flujo osmótico extracelular. Estudios experimentales confirman, que la

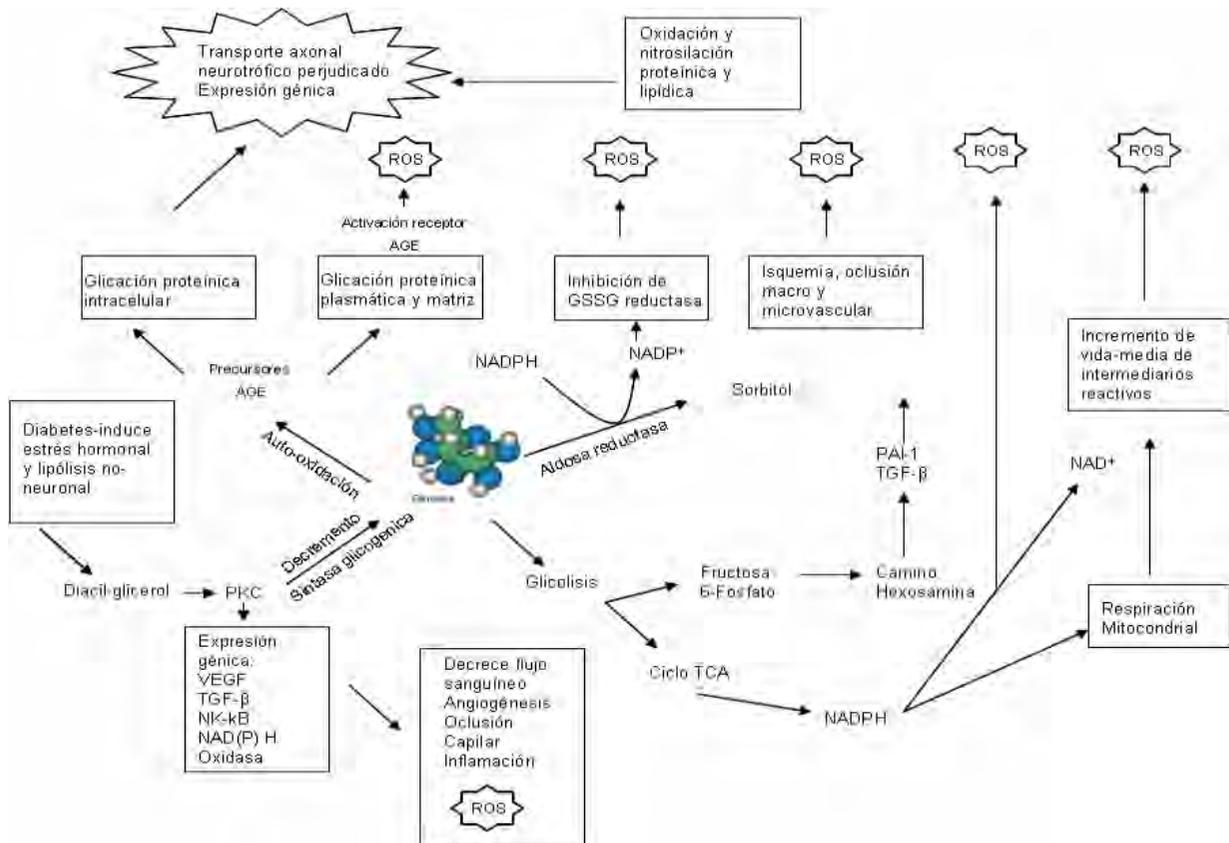
exposición de células a un ambiente hiperosmolar provoca un incremento significativo en el sorbitol intracelular, y reduce la concentración de mioinositol. Estos cambios pueden ser revertidos administrando inhibidores de la aldosa reductasa. La depleción de mioinositol se acompaña de una disminución en su incorporación a los fosfoinositidos. A pesar de lo anterior, esta observación no ha sido consistentemente demostrada en estudios experimentales. Sin embargo, la actividad de la ATPasa  $\text{Na}^+ \text{K}^+$  en el nervio diabético disminuye ostensiblemente, como consecuencia de la depleción de mioinositol, probablemente por la vía del mecanismo de la proteína quinasa C. La ATPasa  $\text{Na}^+ \text{K}^+$ , se localiza primariamente en la región nodal y paranodal de las fibras largas mielinizadas. La reducción de la actividad ATPasa incrementa la concentración de  $\text{Na}^+$  aproximadamente 4 veces, con tumefacción nodal y paranodal, disminución del potencial de membrana de la célula nerviosa y bloqueo selectivo de la conducción nerviosa en las fibras mielinizadas largas.

Por otro lado se define el estrés oxidativo como una situación de desequilibrio entre agentes oxidantes y antioxidantes en favor de los primeros. Hay datos que indican que en la diabetes el estrés oxidativo parece estar causado por un aumento en la producción de radicales libres como por una disminución en los sistemas de defensa antioxidante. Los radicales libres son capaces de producir daño en distintos tejidos y contribuir al establecimiento de las complicaciones tardías de la diabetes (Vincent et al 2004)

Los mecanismos que conducen a la degeneración neuronal son hiperglicemia que implica la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés). El estado diabético produce neurotropismo, deterioro del transporte axonal y expresión génica por cuatro caminos importantes: 1) El exceso de glucosa es desviada hacia glucólisis 2) La glucosa también puede oxidarse y formar AGEs. 3) Estimulación de PKC conduciendo a enfermedades vasculares, inflamación y estrés oxidativo 4) La glucólisis aumenta la enfermedad vascular y la generación adicional del ROS.

Estos mecanismos en última instancia son unidos para la producción de superóxido, por la respiración creciente de glucosa que produce el superóxido en las mitocondrias y también activa la producción-superóxido de NADH oxidasa.

GSSG, glutation disulfide, TCA, ciclo de ácido tricarbóxico. (Vincent et al 2004)



ESQUEMA1. Implicaciones de especies reactivas de oxígeno en la patogenia de la neuropatía diabética: 1) el exceso de glucosa es desviada hacia glucólisis por la vía de los polioles causando depleción de NADPH y capacidad antioxidante celular. 2) La glucosa también puede oxidarse y formar productos finales de glicación avanzada (AGEs por sus siglas en inglés) que alteran la matriz extracelular, activar los receptores que producen intermedios del ROS, y cambiar la función intracelular de la proteína. 3) PKC es activado directamente por intermediarios glucolíticos o indirectamente por segundos mensajeros para estrés hormonal, conduciendo a enfermedades vasculares, inflamación y estrés oxidativo 4) la glucólisis parcial causa la acumulación de intermediarios glucolíticos y conduce al escape de fructosa-6-fosfato a lo largo del camino de hexosamina que aumenta la enfermedad vascular y la generación adicional del ROS.

Estos mecanismos en última instancia son unidos para la producción de superóxido, por la respiración creciente de glucosa que produce el superóxido en las mitocondrias y también activa la producción de nicotidamida adenina dinucleótido (NADH por sus siglas en inglés) oxidasa, glutatión disulfido (GSSG por sus siglas en inglés) y el ciclo de ácido tricarboxílico (TCA por sus siglas en inglés) (Vincent et al 2004)

En estudios experimentales se ha visto que la administración de factores de crecimiento disminuye y previene el daño ocasionado por diversas neuropatías.

Las neurotrofinas son una familia de factores que regulan el crecimiento y la supervivencia del sistema nervioso central y periférico. Proporcionan dos formas de favorecimiento al mantenimiento y desarrollo del sistema nervioso: (1) Mantenimiento trófico (promoviendo supervivencia y/o crecimiento de neuronas) y (2) Mantenimiento trópico (dirigiendo el movimiento y extensión de neuritas). Los factores trófico y trópico promueven la diferenciación y mantenimiento de neuronas sanas y sinapsis adecuadas. Así, las neurotrofinas son vitales para el desarrollo y función del sistema nervioso (Leininger et al 2004).

Las neurotrofinas comprenden cinco tipos de moléculas: factor del crecimiento neural (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF por sus siglas en inglés), y neurotrofinas -3 (NT-3), -4/5 (NT-4/5), y -6 (NT-6) (McDonald et al 1995). Estas moléculas tienen homología secuencial de alrededor del 50%, sugiriendo importancia evolutiva en la regulación del sistema nervioso (Lindsay et al 1994). Aunque son similares en secuencia, las neurotrofinas median individualmente su acción ligada al tipo de célula, según lo determinado por la expresión de sus receptores.

El NGF, juega un papel esencial en la supervivencia y diferenciación de neuronas y de subpoblaciones de neuronas sensoriales durante el desarrollo. El NGF es secretado y sintetizado en el tejido blando para la proyección de las neuronas y se capta hacia terminales presinápticas, presentando translocación, mediante transporte axónico, hacia el cuerpo celular neuronal (Corcoran 1999).

Su efecto esta mediado por la interacción y activación de receptores específicos de la familia TrK, que pertenece a la familia de los receptores con actividad tirosina-cinasa. Una vez activados, desencadenan la fosforilación en proteínas celulares, que a su vez, propagan los efectos de las neurotropinas en la célula.

Por otro lado puede activar a P<sup>75</sup>, este receptor pertenece a una familia de proteínas de superficie celular, que presentan un grado importante de homología a nivel extremo amino-terminal, que determina los diferentes tipos de unión a neurotropinas, su función es inducir apoptosis y junto con su especificidad a ligandos esta implicado a supervivencia celular.

El papel de NGF en las neuronas sensoriales en el adulto no está bien caracterizado en relación con el desarrollo neuronal. Se sugiere que NGF puede regular la expresión fenotípica y las propiedades funcionales de neuronas adultas sensoriales. (Lee et al 2001)

Experimentalmente se ha demostrado que el NGF incrementa el número de neuroblastos si se aplica en un estadio precoz del desarrollo; aumentando el tamaño neuronal y el crecimiento de los axones en el sistema simpático periférico y de los ganglios sensoriales, tanto *in vivo* como *in vitro*; incrementa el tamaño neuronal y la producción de neurotransmisores en ganglios cuando se aplica después de constituidas las sinapsis y después de que hayan dejado de alargarse las prolongaciones neurales. Se trata, de una proteína con influencia profunda sobre el crecimiento y desarrollo neural, especialmente en sistemas adrenérgicos (Bachar et al 2004; Vincent et al 2004).

En 1990, en el laboratorio de Neuroinmunología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, se reportó disminución en los niveles de NGF en suero de pacientes con neuropatía diabética, relacionándose con la severidad la enfermedad y anomalías en la conducción nerviosa (Faradji 1990). Estas aseveraciones fueron confirmadas en estudios subsecuentes (Anand 1996). Experimentalmente se ha encontrado bajos niveles de NGF en el suero y nervio periférico de ratones diabéticos, lo que supone una probable participación del NGF en el desarrollo de neuropatía diabética (Ordóñez et al 1994; Tomlinson et al 1997).

En modelos animales la administración exógena de NGF revierte anomalías morfológicas en fibras mielinizadas asociadas a diabetes, previniendo la progresión de neuropatía (Apfel et al 1992 y 1994; Tomlinson et al 1997; Schmidt et al 2001; Arrieta et al 2005). Aunque algunos estudios clínicos fase II (estudios aleatorios y doble ciego en pacientes), sugieren que la administración subcutánea de factor recombinante humano (rhNFG por sus siglas en inglés) es efectiva al mejorar los síntomas asociados con neuropatía diabética. (Apfel et al 1998; Mc Arthur et al 2000). Un estudio fase III multicéntrico (aleatorio y ciego) demostró sólo un beneficio modesto de los síntomas en la neuropatía diabética, debido a los altos costos ya no se realizaron más estudios (Apfel et al 2000 y 2002).

Por otra parte el ácido retinoico (AR) es esencial para la diferenciación y reproducción celular. El AR ha mostrado tener efectos neurotróficos, además de incrementar la expresión de los factores de crecimiento nervioso, especialmente

de NGF, e incrementar el número de receptores para este factor (Lee et al 1998; Tredici et al 1998; Leininger et al 2004).

Sus efectos celulares del AR son mediante uniones entre receptores nucleares y mediante factores ligando-activados en la transcripción. Existen dos clases de receptores, receptores del ácido retinoico (RARs) y receptores retinoico X (RXRs), con tres subtipos cada uno:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . Los receptores RAR median la expresión génica mediante la formación de heterodímeros con RXRs, mientras que RXRs puede mediar la expresión formando homodímeros o bien formando heterodímeros con receptores huérfanos. Un mecanismo sugerido es a través de la asociación de NGF y tRA es por la unión del receptor nuclear del factor  $\beta$ -inducible (NGFI $\beta$ ) con la subsecuente heterodimerización de receptores retinóico-X (RXRs) y por la rápida inducción en células PC12 al administrar NGF (Corcoran 1999).

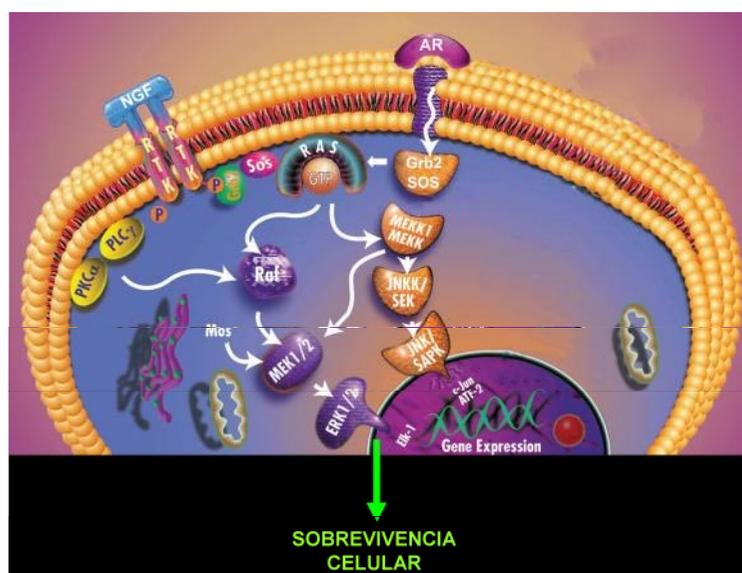
El AR tiene un intenso efecto protector durante el desarrollo, el AR endógeno promueve la diferenciación neuronal y glial, induciendo la diferenciación del neuroblastoma humano e incrementando la síntesis de NFG, lo que sugiere que este puede tener un papel como regulador transcripcional de la regeneración nerviosa (Nakanishi et al 1996; Voigt et al 2000; Mey 2001).

El AR tiene efectos notables en la diferenciación celular y proliferación; entre estos están la interferencia de la activación de varios factores de transcripción, incrementando la expresión de receptor tirosina-kinasa A (trKA) receptor del NFG,

aumentando el NFG dependiente de la sobrevivida de neuronas simpáticas, mejorando la derivación del factor neurotrófico cerebral; regeneración y regulación de la expresión del factor neurotrófico ciliar y mejorando el crecimiento neuronal por la activación del receptor  $\alpha$  del AR en neuronas cultivadas y células PC12

(Von Holst et al 1995; Backman et al 1995; Bogenmann et al 1998; Plum et al 1996; Cosgaya et al 1996; Mey et al 1999; Wang et al 1998; Brant et al 2002).

El ácido retinoico puede potenciar el efecto neuroprotector del NGF y otras sustancias neurotróficas que comparten vías intracelulares relacionadas con el crecimiento neuronal y sobrevivida (Mey et al 1999; Plum 2001). En un sistema de retroalimentación, el AR y el NGF pueden potenciarse el uno al otro, el NGF induce la síntesis de AR por la vía de expresión de la enzima deshidrogenasa retinaldehido tipo 2, mientras la inhibición de la síntesis de AR bloquea el crecimiento neural dependiente de NGF, además de incrementar los niveles de NGF, el AR estimula directamente el crecimiento neural por las mismas vías del NGF (Corcoran 1999).



ESQUEMA 2 Posible vía de acción del ácido retinoico de la estimulación del factor de crecimiento neural. La cascada inicia cuando el NGF y AR se unen al receptor de tirosin-quinasa (Trk por sus siglas en inglés) causando una fosforilación a receptores intracelulares de tirosinas. La unión de la proteína Src homólogo/colagena (Shc por sus siglas en inglés) a estos residuos fosforilados puede activar el fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K) y caminos de la activación de proteína quinasa MAPK. Los caminos de PI3K y de MAPK traducen señales de supervivencia a la neurona. Así, el transporte retrógrado de endocitosis de los receptores de Trk promueve supervivencia y la regeneración neuronales. La activación de neurotrofinas también es mediada por la fosfolipasa-C-g1 (PLC- $\gamma$  por sus siglas en inglés) y el receptor del factor de crecimiento fibroblástico sustrato-2

(FRS-2) cuando estas proteínas son unidos con residuos fosforilados de tirosina o receptores de tirosina-quinasa (Leininger et al 2004).

La administración de all trans-ácido retinoico en ratones diabéticos disminuye la alteración bioquímica, morfológica y clínica de la neuropatía diabética. La depleción drástica de factor de crecimiento neural en ratones diabéticos, no solo fue revertida, sino con la administración de AR se incrementó significativamente comparado con los controles sanos (Arrieta et al 2005).



## OBJETIVO

Determinar el efecto del tratamiento con all-trans ácido retinoico cuando la neuropatía ha sido establecida.

## OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar el efecto de la administración de AR sobre las concentraciones de NGF en ratones diabéticos con neuropatía.

Determinar el efecto de la administración de AR sobre las alteraciones en sensibilidad en ratones diabéticos con neuropatía.

Determinar el efecto de la administración de AR sobre las alteraciones ultraestructurales en nervio periférico de ratones con neuropatía.



## HIPÓTESIS

La administración del ácido retinoico en ratones con neuropatía diabética aumentará el contenido de NGF en suero y nervio ciático.

La administración de AR en ratones diabéticos reducirá las alteraciones sensitivas inducidos por la neuropatía.

La administración de AR revertirá las alteraciones ultraestructurales en nervio ciático inducidos por neuropatía



## METODOLOGÍA

Para la realización de este estudio, fueron utilizados 120 ratones albinos machos, cepa NIH con un peso promedio de 20 gramos y 2 meses de edad.

Los animales fueron separados aleatoriamente en cuatro grupos. Los animales del grupo B (DM, n=30) recibieron intraperitonealmente estreptozotocina (STZ) (Sigma Chemicals Co. L. St Louis, MO), 50 mg/kg durante 5 días, con el fin de inducir diabetes mellitus (DM) (Sandler et al 1985; Ordóñez et al 1994). El grupo C (DM más AR, n=30) recibió STZ de la misma forma que el grupo B; 30 días después y posterior a que se documentó la neuropatía sensitiva, recibieron diariamente, una inyección subcutánea de 20 mg/kg de la isoforma all-trans ácido retinoico (Sigma & Aldrich) suspendido en aceite de maíz durante 90 días; y el grupo D (AR, n=30) solo recibió 20 mg/kg de all-trans ácido retinoico subcutáneamente. El grupo A (control, n=30) solo recibió subcutáneamente el vehículo (aceite de maíz durante 60 días) **Figura 1.**

Después de la administración de STZ se realizaron dos cuantificaciones de glucosa sérica, al inicio y al final del tratamiento con AR. La muestra de sangre se obtuvo por punción en la cola de los ratones y se cuantificó por medio de un glucómetro comercial y tiras reactivas (BAYER México). El peso de los animales fue determinado al inicio y al final del tratamiento con AR.

La prueba nociceptiva se realizó el día 30 y 90, (antes y después del tratamiento con AR) a todos los animales, se determinó el tiempo del retiro de la cola del ratón

de un baño de agua a 52°C. La temperatura se mantuvo constante durante la prueba (Malan et al 2002). Al día 90 se sacrificaron los animales por inhalación de éter y se obtuvo la muestra de sangre por punción cardíaca además se resecaron ambos nervios ciáticos.

## CUANTIFICACIÓN DE FACTOR DE CRECIMIENTO NEURAL

Para la cuantificación de NFG sérico y de nervio periférico, se utilizó la técnica de ensayo inmunoenzimático (ELISA).

Para cuantificar NGF sérico, se obtuvo la muestra de sangre mediante punción cardíaca, inmediatamente después se separó el suero por centrifugación y se añadieron 20µg/ml de aprotinina como inhibidor de proteasa. La muestra se congeló a -70 °C hasta la realización del análisis.

Para la medición de NFG en muestra nervio periférico, se extrajo nervio ciático y se homogenizó 1:1 (peso/volumen) con buffer Tris-HCl 100mmol/l, NaCl 400 mmol/l albúmina 2%, azida sódica 0.05%, pH 7.0 y los siguientes inhibidores de proteasa: PMSF 1mmol/l, aprotinina 7 mg/ml y EDTA 4 mmol/l. Posteriormente la muestra se centrifugó a 1000 000x g por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido se mezcló 1:1 con 0.2% de Tritón - X-100 de CaCl<sub>2</sub> 20mmol/l.

Las muestras de nervio ciático y suero se procesaron en placas de microtitulación previamente unidas a anticuerpos monoclonales contra el NGF (anti-β [2.5 S] 0.1 mn/ml NFG) incubadas a 37°C por dos horas y después lavadas con buffer de

HCL/tritón X-100, pH 7. Posteriormente se tomaron 200 $\mu$ l del suero y nervio de la muestra y se diluyeron sucesivamente en el mismo buffer (1:2 suero; 1:5 nervio ciático) se incubaron a 4°C toda la noche. Las placas se lavaron en tres tiempos con buffer Tris-HCL y el anticuerpo monoclonal mouse anti- $\beta$  (2.5 S); el NGF fue marcado con  $\beta$ -galactosidasa (Boehringer) en una solución 1:10. Después se puso a incubar 4 horas a 37°C se lavaron los pozos y la enzima se desarrolló como una solución en el sustrato de clorofenol rojo galactopirozina. La reacción colorimétrica se leyó a los 90 minutos, en el espectrofotómetro a 570 nm. Para cada muestra, el contenido de NGF se determinó al comparar el valor de la densidad óptica con una curva estandarizada hecha con diluciones sucesivas de NGF en un buffer que contenga de 5 a 300 pg/ml de NGF.

#### PRUEBA DE SENSIBILIDAD

Para medir umbral de propiocepción térmica se utilizó un *baño maría* con el agua a una temperatura constante de 48°C, para esta prueba se sujetó al ratón y se sumergió la cola dentro del agua, y se tomó el tiempo en que tratara de sacarla.

#### MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Para la evaluar el daño morfológico al nervio periférico, se disectó el nervio ciático, en la porción distal, posteriormente se fijó con glutaraldehído al 4% se lavó con PBS al 2.5 % y fue posfijado con tetróxido al 0.5% por 1 hora, se deshidrató con acetona y se incluyó en bloques de resina. Se realizaron cortes finos de la sección transversal del nervio, después se tiñeron con acetato de uranil/ citrato de plomo, y

se examinaron bajo microscopía electrónica de transmisión (Zeiss EM-10Á). La determinación del daño observado en nervio periférico, se analizó mediante conteo de células mielínicas, células de Schwann, células amielínicas, espacio endoneural, células remielinizadas y células muertas (Jacobs, et al 1985; Ochoa, et al 1969)

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El tiempo de latencia, el contenido de NGF, tanto en suero como en nervio y concentraciones de glucosa fueron presentados como medias  $\pm$  desviación estándar (DE). Para comparación de análisis indiferenciados fue utilizado análisis de varianza (ANOVA) en el test Kruskal-Wallis de acuerdo a la distribución de datos (normal y no-normal) determinado por la prueba Kolmogorov-Smirnov. El valor fue fijado  $p=0.05$ . El análisis se realizó usando el software SPSS para Windows versión 12.



## RESULTADOS

No se encontró diferencias en peso corporal de los animales entre todos los grupos al día 30 y 90. Los niveles de glucosa en suero, antes de inicio del tratamiento (en el día 30) fueron significativamente más altos en los grupos de DM ( $287.5 \pm 75\text{mg dL}^{-1}$ ) y DM más AR ( $314.28 \pm 80\text{mg dL}^{-1}$ ), cuando fueron comparados con el grupo control ( $78 \pm 17\text{mg dL}^{-1}$ ) y AR ( $90 \pm 23\text{mg dL}^{-1}$ ) ( $p < 0.001$ ). No existieron diferencias entre los grupos de DM y DM más AR (**Figura 2A**). Los niveles de glucosa en el día 90, (posterior al tratamiento con vehículo y AR), fueron también significativamente mayores en los grupos DM ( $271 \pm 56\text{mg dL}^{-1}$ ) y DM más AR ( $282.85 \pm 84\text{mg dL}^{-1}$ ) con respecto a los grupos control ( $90 \pm 21.3\text{mg dL}^{-1}$ ), y el grupo AR ( $90 \pm 21.3\text{mg dL}^{-1}$ ). No existieron diferencias entre los grupos de DM y DM más RA (**Figura 2B**).

Los resultados de la prueba de sensibilidad pretratamiento, mostraron un aumento en el tiempo de latencia de los grupos DM ( $23.18 \pm 3.7$  segundos) y DM más AR ( $22.05 \pm 3$  segundos) cuando se compara con el grupo control ( $10.9 \pm 2.6$  segundos) y el grupo de AR ( $12 \pm 3.6$  segundos) ( $p < 0.001$ ). No existieron diferencias entre los grupos de DM y DM más AR. (**Figura 3A**). La prueba de sensibilidad postratamiento (al día 90) mostró un aumento en el tiempo de latencia solo en el grupo de DM ( $27 \pm 3.93$  segundos) comparado con el grupo control ( $12.8 \pm 2.9$  segundos), AR ( $13.2 \pm 3$  segundos) y DM más AR ( $10 \pm 2$  segundos) ( $P < 0.0001$ ). No existieron diferencias entre estos últimos grupos. (**Figura. 3B**)

Los contenidos en suero y nervio ciático se muestran en la **figura 4 A y B**. NGF en suero decreció en el grupo DM ( $54.7 \pm 51.3 \text{ pg/mg}^{-1}$ ), cuando se compara con el grupo control ( $110 \pm 10 \text{ pg/mg}^{-1}$ ), AR ( $121 \pm 11 \text{ pg/mg}^{-1}$ ) y DM más AR ( $280 \pm 50 \text{ pg/mg}^{-1}$ ) ( $P < 0.0001$ ). NGF en nervio solo decreció en el grupo DM ( $758 \pm 51 \text{ pg/mg}^{-1}$ ) cuando se compara con el grupo control ( $1,482 \pm 101 \text{ pg/mg}^{-1}$ ) y AR ( $1,585 \pm 119 \text{ pg/mg}^{-1}$ ) ( $p < 0.05$ ). Sin embargo el contenido de NGF se incrementa en el grupo DM más AR ( $2,380 \pm 524 \text{ pg/mg}^{-1}$ ) cuando se compara con el grupo control, AR y DM ( $P < 0.001$ ).

Los resultados del análisis ultraestructural se muestran en la **Fig. 5** y se representan en la **Fig. 6**. Solo se encontraron diferencias entre grupos en número de fibras amielínicas y regeneración neural. La media de axones amielínicos fue significativamente mas bajo en los ratones diabéticos ( $37,116 \pm 2,599$ ) que los grupos controles y AR ( $34,179 \pm 5,238$   $p=0.034$  y  $46,0008 \pm 5,568$   $P=0.007$  respectivamente). No se encontraron diferencias significativas entre los animales diabéticos tratados con AR ( $68,372 \pm 7,856$ ) y los otros grupos. Los ratones diabéticos tratados con AR tienen evidencia significativa de regeneración neural ( $1,127 \pm 141$ ), cuando se comparan con los controles ( $90.7 \pm 48$ ), DM ( $24 \pm 20$ ) y el grupo AR ( $100 \pm 79$ ) con una  $P < 0.0001$ .



## DISCUSIÓN

Los ratones diabéticos, tanto del grupo B (DM) y C (DM más AR) presentaron neuropatía claramente establecida manifestada por hipoestesia, a las 6 semanas posterior al tratamiento con STZ y antes de recibir tratamiento (vehículo y AR respectivamente), similar a las manifestaciones clínicas de pacientes con neuropatía diabética (Vinik 2006). La administración de AR en ratones del grupo C, revirtió las alteraciones en la sensibilidad con tiempos de latencia similares a las que se obtuvieron en el grupo A (control) y el grupo D (AR).

Los cambios no solo fueron a nivel sensitivo, sino también revirtió las alteraciones morfológicas ultraestructurales e incrementó la regeneración neuronal.

En un estudio previo, nosotros demostramos que el AR es capaz de prevenir el desarrollo antes de que la neuropatía este establecida (Arrieta et al 2005), sin embargo estos resultados tuvieron un impacto limitado debido a que el tratamiento con AR disminuyo también, los niveles de glucosa en suero; posiblemente consecuencia de un efecto agonista sobre el receptor de la peroxisoma proliferación-activación (PRAR por sus siglas en ingles), el cual induce la expresión de múltiples genes que regulan el metabolismo de la glucosa (Lee 2006)

Ahora en este estudio mostramos que el tratamiento con AR revierte la neuropatía, previamente establecida sin cambio en los niveles de glucosa de ratones diabéticos antes y después del tratamiento (Figura 1).



## CONCLUSIÓN

Este estudio confirma que el ácido retinoico puede revertir el daño producido por la neuropatía diabética induciendo la producción de NGF en el modelo experimental de neuropatía diabética. Esto sugiere un potencial efecto terapéutico del AR en pacientes con neuropatía.



## BIBLIOGRAFÍA

1. Escobedo-de la Peña J. Frecuencia de la diabetes mellitus. Morbilidad y Mortalidad. En Clínicas Médicas Mexicanas. México, D.F Mc Graw-Hill-Interamericana, 1993.
2. Vázquez-Robles M, Escobedo-de la Peña J. Análisis de la mortalidad por diabetes mellitus en el Instituto Mexicano del Seguro Social. Rev Med Inst Mex Seguro Soc 1990;28:157-179.
3. Vázquez-Robles M, Romero-Romero E, Escandón-Romero C, Escobedo-de la Peña J. Prevalencia de diabetes mellitus no insulino dependiente y factores de riesgo asociados en una población de México, D.F. Gac Med Mex 1993; 129:191-199.
4. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1998; 21:S5-S17.
5. Reporte de la organización mundial de la salud (OMS) y la Federación Internacional de Diabetes 2003.
6. Pourmand, R., 1997. Diabetic neuropathy. *Neurol. Clin.* Aug; 15(3) 569 – 576.
7. Guthrie R, A.Guthrie D, W. Pathophysiology of Diabetes Mellitus. *Crit Care Nurs Q* 2004;27(2) 113–125.
8. Vincent AM, Russel JW, Low P, Feldman EL. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocrine Reviews* 2004; 25(4):612-628.
9. Leininger GM, Vincent AM, Feldman EL, The role of growth factors in diabetic peripheral neuropathy *Journal Perip Nerv Syst*, 2004;9:26-53.

10. McDonald NQ, Murray-Rust J, Blundell TL. The first structure of a receptor tyrosine kinase domain: a further step in understanding the molecular basis of insulin action. *Structure*. 1995 Jan 15;3(1):1-6.
11. Lindsay R, M. Neurotrophins and receptors. *Prog Brain Res*. 1994;103:3-14.
12. Corcoran, J., Maden, M. 1999. Nerve growth factor acts via retinoic acid synthesis to stimulate neurite outgrowth. *Nat Neurosci* 2 (4), 307-308.
13. Lee, PG. Hohman, TC., Cai, F., Regalia, J., Helke, CJ. 2001. Streptozotocin induced diabetes causes metabolic changes and alterations in neurotrophin content and retrograde transport in cervical vagus nerve. *Exp Neurol*. 170 (1), 149-161.
14. Bachar O, Adner M, Uddman R, Cardell LO. 2004. Nerve growth factor enhances cholinergic innervation and contractile response to electric field stimulation in a murine in vitro model of chronic asthma. *Clin Exp Allergy*. Jul; 34(7):1137-45.
15. Faradi V, Sotelo J. Low serum levels of nerve growth factor in diabetic neuropathy. *Acta Neurol Scand*. 1990;81:402-410.
16. Anand P, Terenghi G, Warner G, Kopelman P, Williams-Chestnut RE, Sinicropi DV. The role of endogenous nerve growth factor in human diabetic neuropathy. *Nat. Med*. 1996; 2:703-707.
17. Ordoñez G, Fernandez A, Perez R, Sotelo J. Low contents of nerve growth factor in serum and submaxillary gland of diabetic mice. *J Neurol Sci* 1994;121: 163-166.

18. Tomlinson DR, Fernyhough P, Diemel LT Role of neurotrophins in diabetic neuropathy and treatment with nerve growth factors. *Diabetes*. 1997;46(2): 43-49.
19. Apfel C, Bauer F, Crettaz M, Forni L, Kamber M, Kaufmann F, LeMotte P, Pirson W, Klaus M.A retinoic acid receptor alpha antagonist selectively counteracts retinoic acid effects. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Aug 1;89(15):7129-33.
20. Schmidt RE, Dorsey DA, Beaudet LN, Plurad SB, Parvin CA, Yarasheski KE, Smith SR, Lang HJ, Williamson JR, Ido Y. Inhibition of sorbitol dehydrogenase exacerbates autonomic neuropathy in rats with streptozotocin-induced diabetes. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2001 Dec;60(12):1153-69.
21. Arrieta O, Garcia-Navarrete R, Zuniga S, Ordonez G, Ortiz A, Palencia G, Morales-Espinosa D, Hernandez-Pedro N, Sotelo J. Retinoic acid increases tissue and plasma contents of nerve growth factor and prevents neuropathy in diabetic mice. *Eur J Clin Invest*. 2005 Mar;35(3):201-7.
22. Apfel SC, Kesler JA, Adornato BT, Litchy WJ, Sanders C, Rask CA. NGF Study group. Recombinant human nerve growth factor in the treatment of diabetic polyneuropathy. *Neurology* 1998;51:695-702.
23. McArthur J.C, Yiannoutsos C, Simpson DM, Adornato BT. A phase II trial of nerve growth factor for sensory neuropathy associated with HIV infection. *Neurology* 2000; 54(5):1080-1088.
24. Apfel SC. Neurotrophic factors and pain. *Clin J Pain*. 2000 Jun;16(2 Suppl):S7-11. Review.

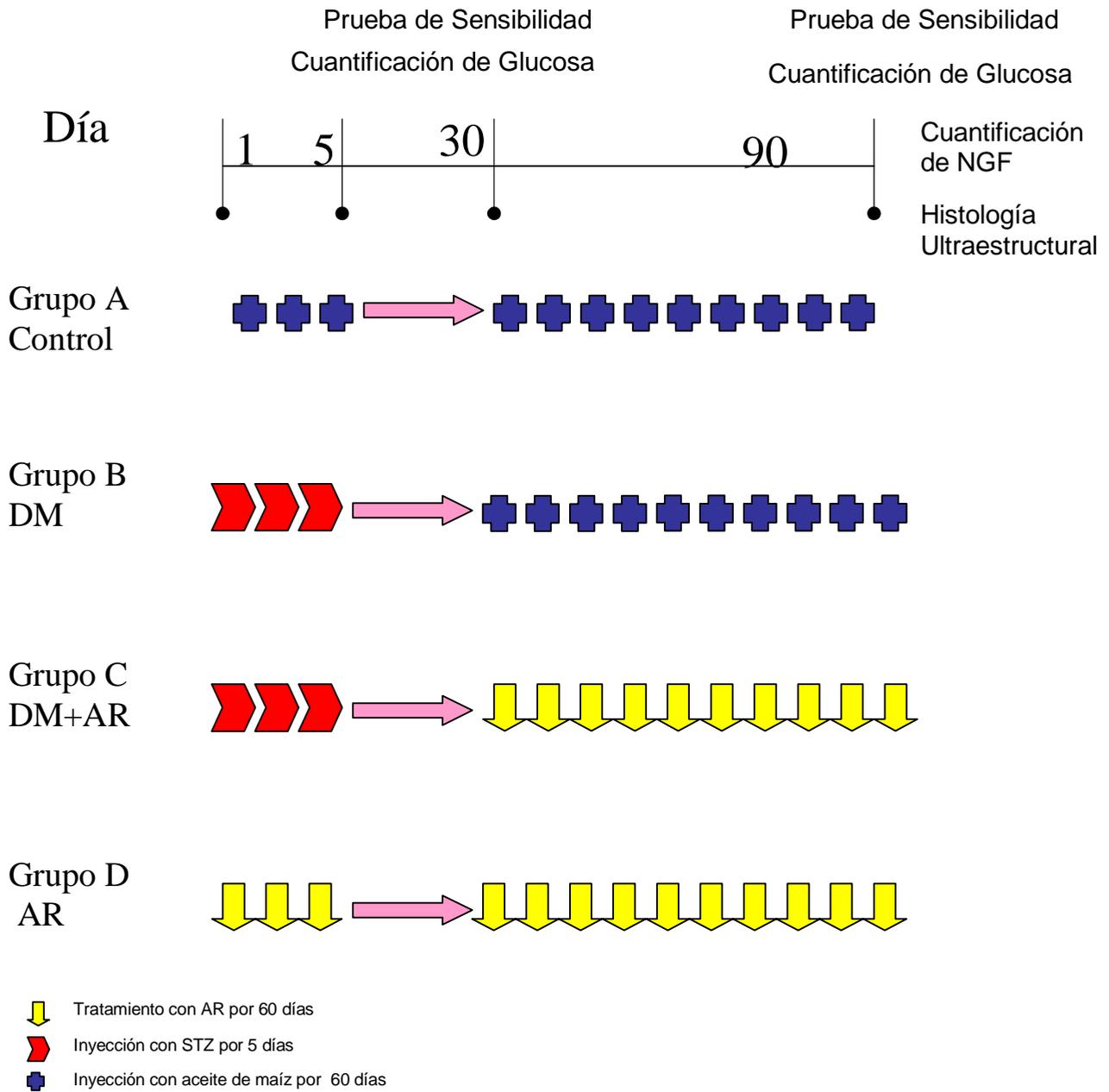
25. Apfel SC. Nerve growth factor for the treatment of diabetic neuropathy: what went wrong, what went right, and what does the future hold? *Int Rev Neurobiol* 2002; 50:393-413.
26. Lee SE, Shen H, Tagliatela G, Chung JM, Chung K. 1998 Expression of nerve growth factor in the dorsal root ganglion after peripheral nerve injury. *Brain Res.* Jun 15; 796(1-2):99-106.
27. Tredici G, Gabbrica D, Minoia C, Cavaletti G. Experimental cisplatin neuropathy in rat and the effect of retinoic acid administration. *J Neurooncology* 1998;36: 31-40.
28. Nakanishi, T., Ishii, K., Fukushima, N., Asnuma, M., Iwata, E., Ogawa, N. 1996. Expresión of mRNA encodiing neurotrophic factors and its regulation in a hybrid neuronal cell line. *Bichem Mol Biol Int* 38 (4), 763-772.
29. Voigt, A., Hartmann, P., Zintl, F. 2000. Differentiation, proliferation and adhesion of human neuroblastoma cell after tratment whit retinoic acid. *Cell Adhes Commun* 7 (5), 423-440.
30. Mey, J. 2001. Retinoic acid as a regulator of citokine signaling nerve injury. *Z Naturforsch* 56, 163-176.
31. Von Holts, A., Rodriguez-Tebar, A., Michaille, JJ., Dhouailly, D., Backstrom, A., Ebendal, T., Rohrer, H. 1995. Retinoic acid-mediated increase TrkA expression in sufficient to elicit NFG-depend survival of sympathetic neurons. *Mol Cell Neurosci* 6 (3), 185-198.
32. Backman C, Biddle PT, Ebendal T, Friden PM, Gerhardt GA, Henry MA, Mackerlova L, Soderstrom S, Stromberg I, Walus L, et al 1995. Effects of

transferrin receptor antibody-NGF conjugate on young and aged septal transplants in oculo. *Exp Neurol*; 132(1):1-15.

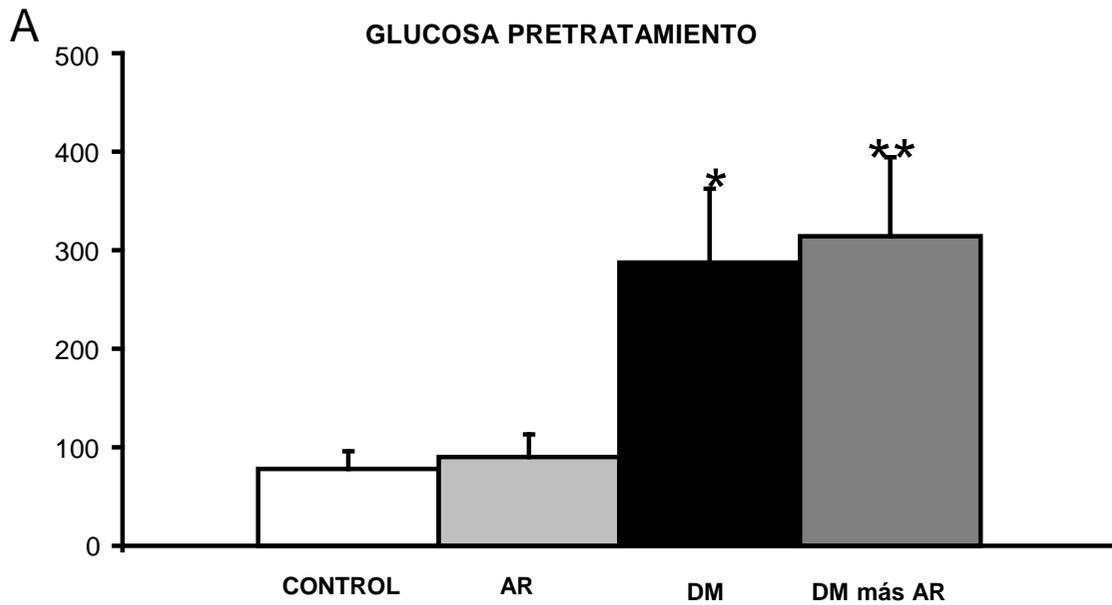
33. Bogenmann, E., Peterson, S., Maekawa, K., Matsushima, H. 1998. Regulation of NGF responsiveness in human neuroblastoma. *Oncogene* 17 (18), 2367-2376.
34. Plum LA., Clagett-Dame, M. M. 1996. All trans-retinoic acid stimulates and maintains neurite outgrowth in nerve growth factor-supported developing chick embryonic sympathetic neurons. *Dev Dyn* 205 (1), 53-63.
35. Cosgaya, JM., Garcia-Villalba, P., Perona, R., Aranda A. 1996. Comparison of the effects of retinoic acid and nerve growth factor on PC12 cell proliferation, differentiation and gene expression. *J Neurochem* 66 (1), 89-98.
36. Mey, J. Rombach, N. 1999. Retinoic acid increases BDNF-dependent regeneration of chick retinal ganglion cell in vitro. *Neuroreport*. 10, 3573-3577.
37. Wang, X., Halvorsen, SW. 1998. Retinoic acid up-regulates ciliary neurotrophic factor receptors in cultured chick neurons and cardiomyocytes. *Neuroscience Letters*. 240, 9-12.
38. Brand, C., Ségard, P., Plouvier, P., Formstecher, P., Danzé, PM., Lefebvre, P. 2002. Selective alteration of gene expression in response to natural and synthetic retinoids. *BMC Pharmacol* 2 (1), 13-27.
39. Jacobs JM, Love S. Quantitative and qualitative morphology of human sural nerve at different ages. *Brain* 1985; 108: 897-924.
40. Ochoa J, Mair W. The normal sural nerve in man II. Changes in the axons and Schwann cells due to ageing. *Acta Neuropathol* 1969;13(3):217-239.

41. Crandall J, Sakai Y, Zhang J, Koul O, Mineur Y, Crusio WE *et al.* 13-Cis retinoic acid suppresses hippocampal cell division and hippocampal-dependent learning in mice. *PNAS* 2004;101 (14):5111–6.
42. Kitano Y, Yoshimura G, Uchida K, Sato K, Hari K. Pretreatment with topical all-trans-retinoic acid is beneficial for wound healing in genetically diabetic mice. *Arch Dermatol Res* 2001; 293 (10):515–21.
43. Singh Ahuja H, Liu S, Crombie DL, Boehm M, Leibowitz MD, Heyman RA *et al.* Differential effects of rexinoids and thiazolidinediones on metabolic gene expression in diabetic rodents. *Mol Pharm* 2001; 59 (4):765–73.
44. Yamauchi T, Waki H, Kamon J, Murakami K, Motojima K, Komeda K *et al.* Inhibition of RXR and PPAR $\gamma$  ameliorates diet-induced obesity and type 2 diabetes. *J Clin Invest* 2001;108 (7):1001–13.

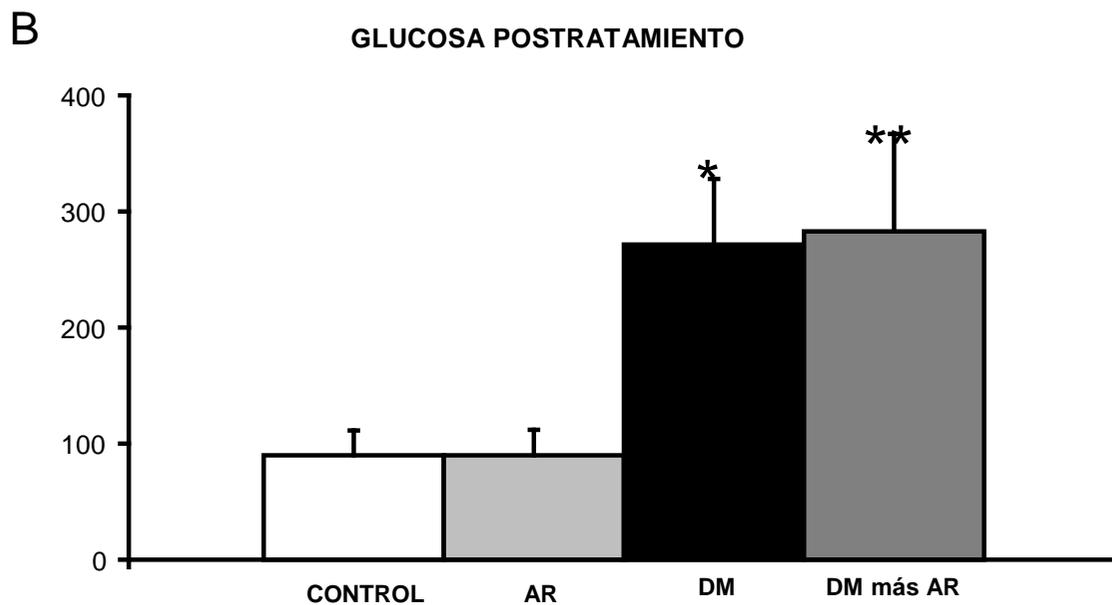




**FIGURA 1** Esquema de tratamiento utilizado en este estudio.

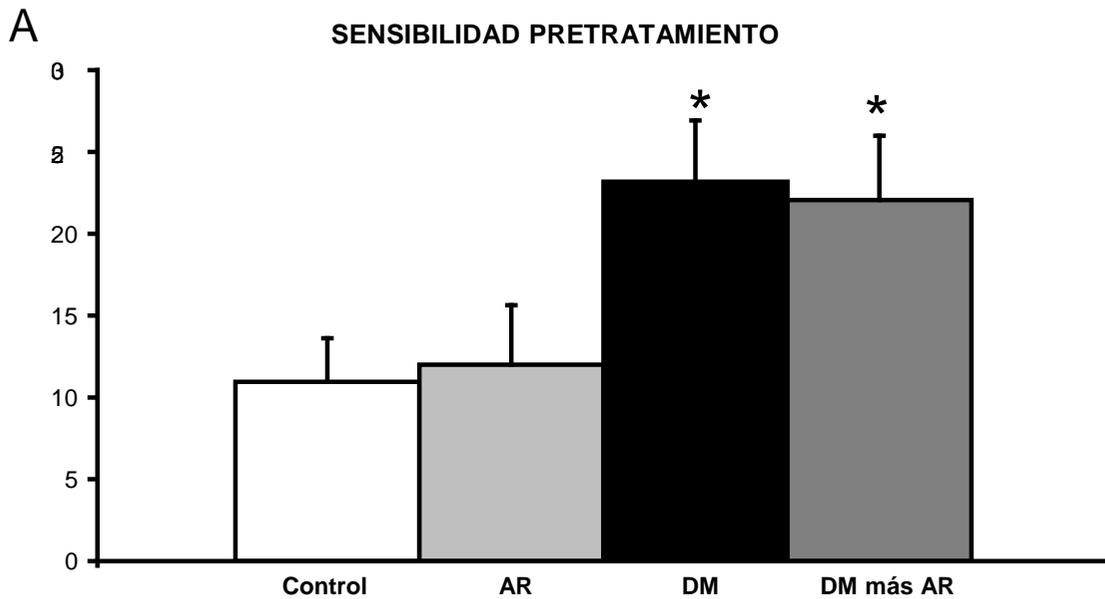


\*p<0.001 Cuando se compara con Control y AR  
 \*\*p<0.001 Cuando se compara con Control y AR

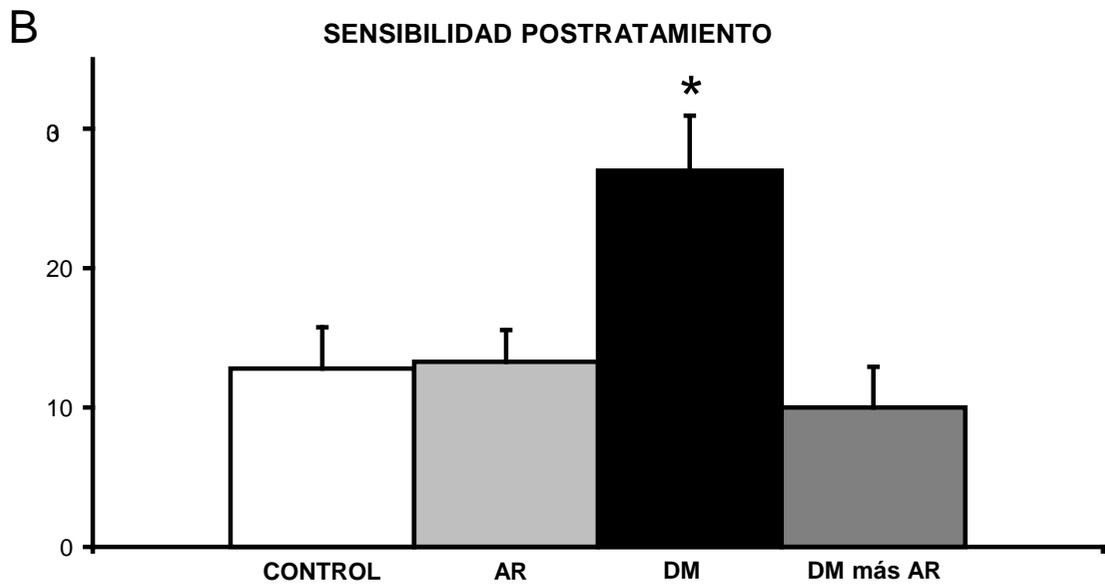


\*p<0.001 Cuando se compara con Control y AR  
 \*\*p<0.001 Cuando se compara con Control y AR

**FIGURA 2** Niveles de glucosa en sangre de los grupos tratados DM y DM más AR muestran un aumento significativo ( $p=0.001$ ), con respecto al grupo control (A). Las concentraciones de glucosa se mantuvieron altas en la segunda cuantificación. (B).

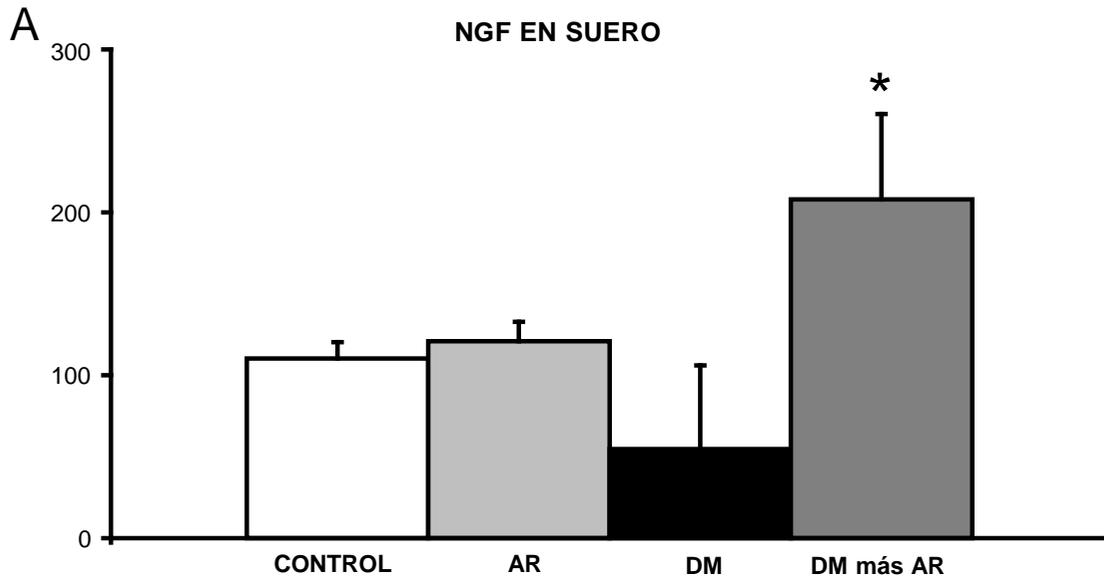


\*p<0.001 Cuando se compara con Control y AR  
 \*\*p<0.05 Cuando se compara con Control y AR

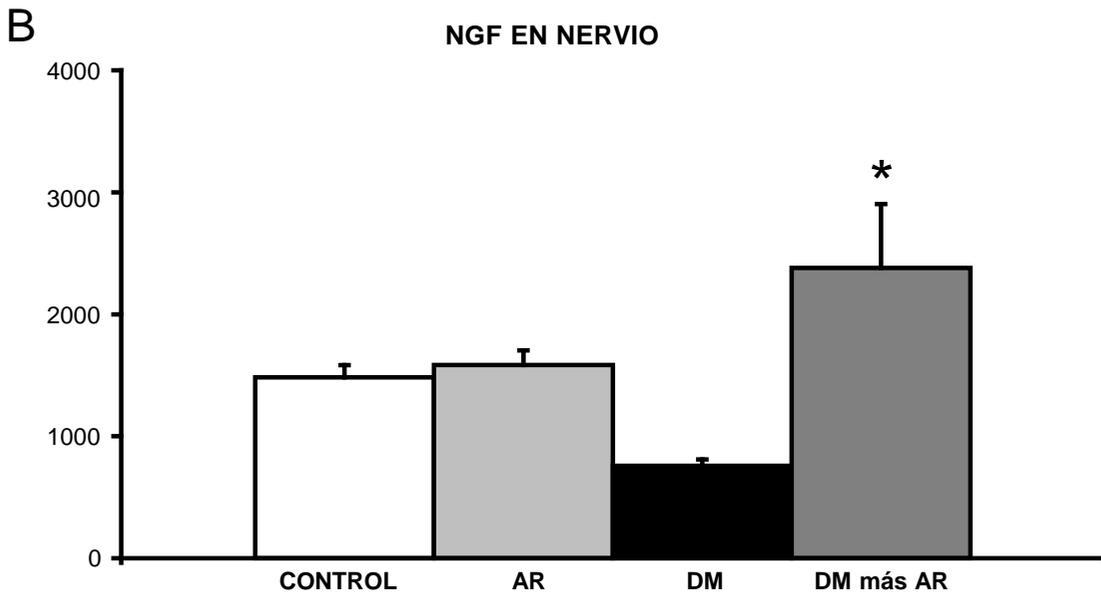


\*p<0.001 Cuando se compara con DM y AR  
 \*\*p<0.05 Cuando se compara con Control y AR

**FIGURA 3** La prueba de sensibilidad para temperatura muestra disminución en la prueba termosensible en los grupos DM y DM más AR tratados con STZ ( $p=0.001$ ). Esto confirma el desarrollo de la neuropatía (A). La prueba postratamiento muestran incremento en sensibilidad a temperatura en los animales tratados con AR ( $p=0.0001$ ) comparados con el grupo DM sin tratamiento (B).

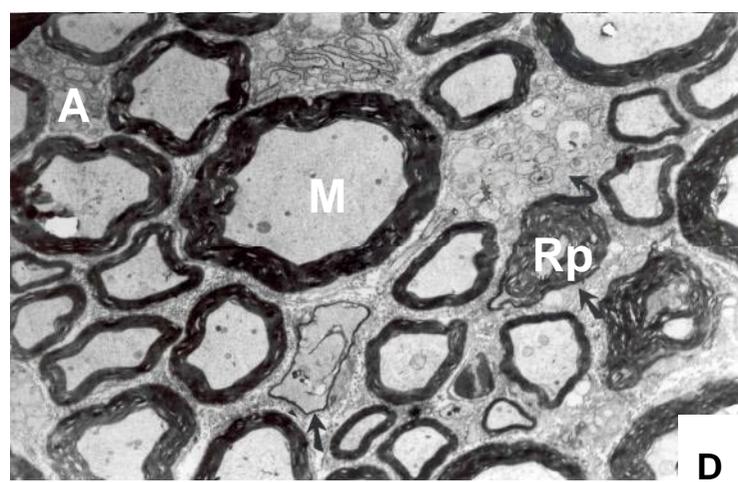
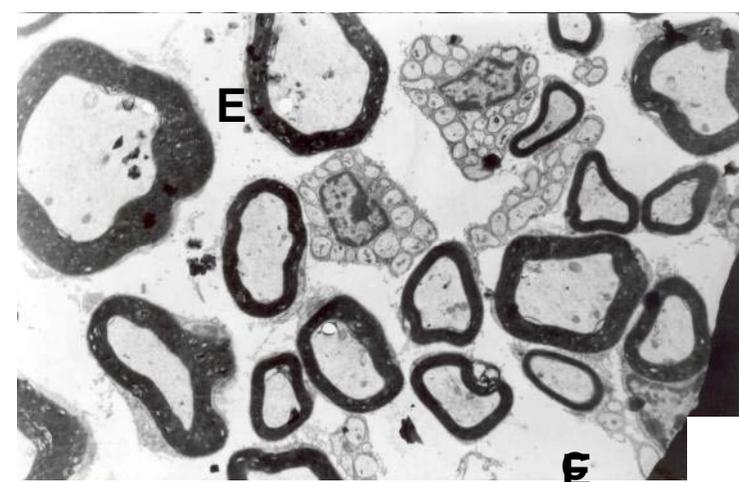
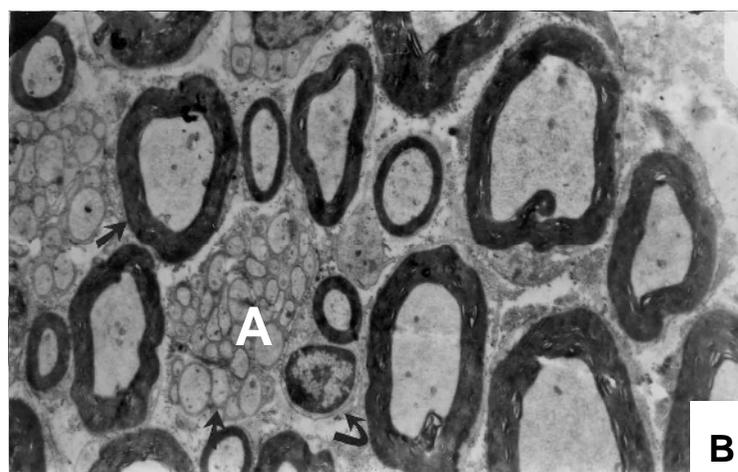
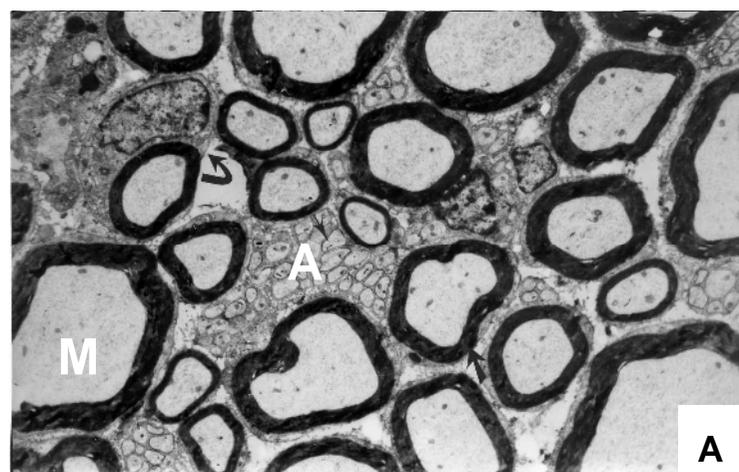


\*p<0.001 Cuando se compara con DM  
 \*p<0.05 Cuando se compara con Control y AR

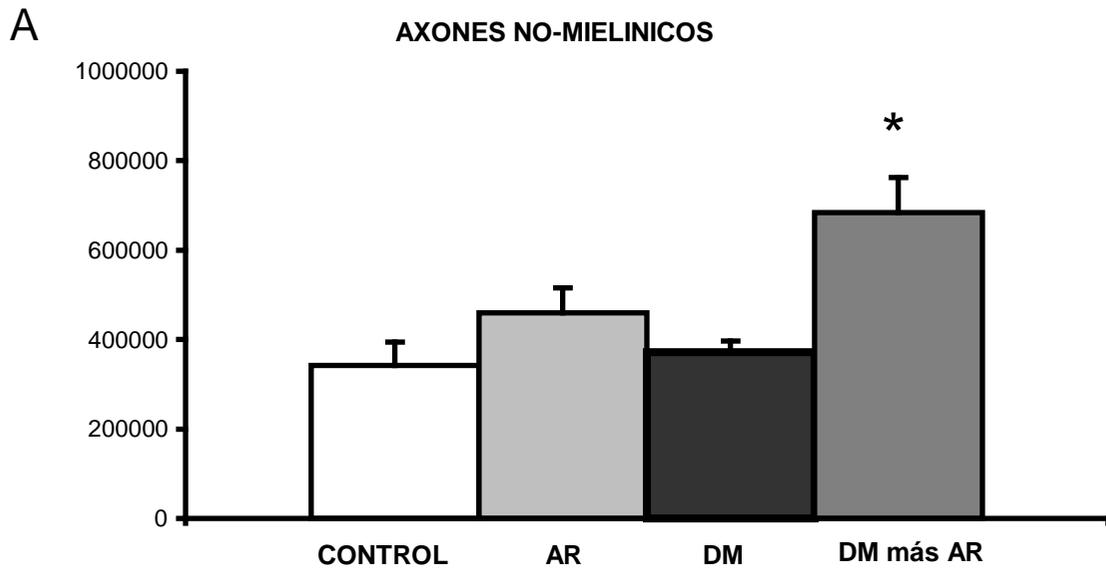


\*p<0.001 Cuando se compara con DM  
 \*p<0.05 Cuando se compara con Control y AR

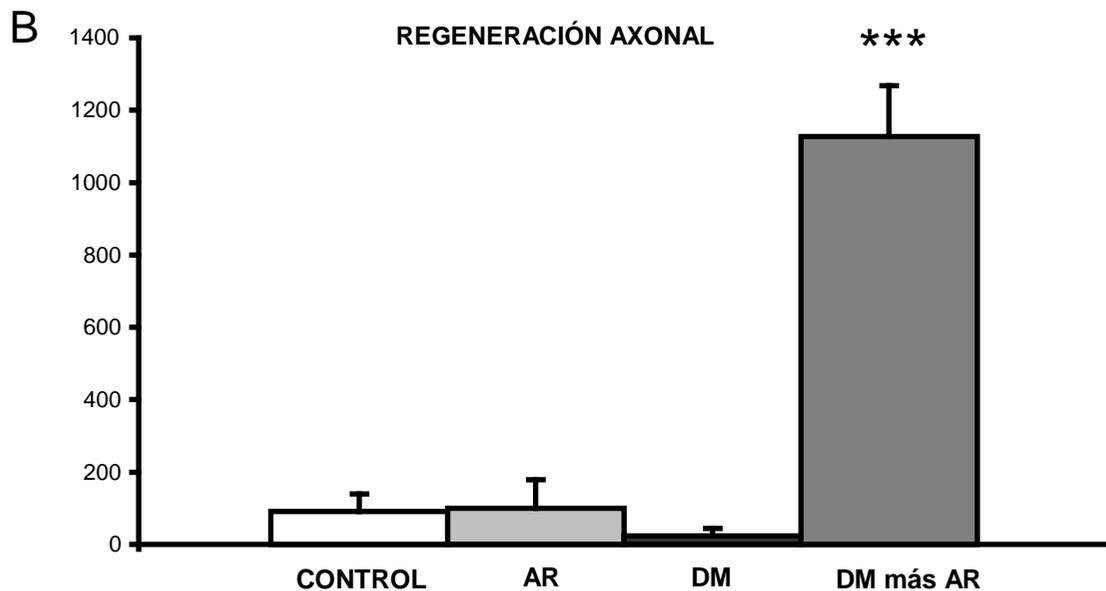
**FIGURA 4** Concentraciones de NGF in suero (A) y nervio ciático (B) son aumentados cuando los animales son tratados con AR ( $p=0.0001$ ). Por lo contrario, se muestra una disminución de NGF in nervios periféricos en animales del grupo DM, no tratados, comparados con el grupo Control ( $p=0.001$ ).



**FIGURA 5** Imagen ultraestructural del nervio ciático de controles, tratados con AR, DM y ratones control (x 6958). A) En los ratones control se encuentran preservados los axones mielínicos (M) y amielínicos (A). B) Se encontró resultados similares a los controles en el grupo AR C). En ratones diabéticos tratados con AR, la preservación de axones amielínicos y evidencia de regeneración neural (Rp) fue encontrada, no se observó incremento en el espacio endoneural (E). D) En ratones diabéticos sin tratamiento se encontraron axones amielínicos e incremento del espacio endoneural (E).



\* $p < 0.034$  y \* $p < 0.007$  Cuando se compara con ratones Control y AR, respectivamente



\*\*\* $p < 0.0001$  Cuando se compara con ratones Control, AR Y DM

**FIGURA 6** A) La cuantificación de el número de axones mielínicos fue significativamente mas bajos en los ratones diabéticos cuando se compara con los grupos control ( $P=0.034$ ) y AR ( $p=0.007$ ). B) Con respecto a las bandas de regeneración se muestra un incrementó en el grupoDM tratado con AR ( $p=0.0001$ ) en comparación con los demás grupos.