



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFFECTO DE LA METFORMINA SOBRE LAS
TERMINALES NERVIOSAS DEL CEREBRO DE
RATA EN UN MODELO AGUDO DE DAÑO POR
ESTRÉS OXIDATIVO**

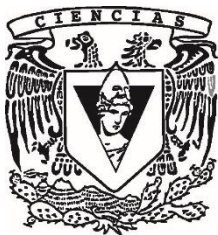
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

DIANA IRIS HERNÁNDEZ ROJAS



**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. IRMA GABRIELA GONZÁLEZ HERRERA**

Ciudad Universitaria, CD.MX , 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno
Hernández
Rojas
Diana Iris
5545688743
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
307069269

2. Datos del tutor
Doctora
Irma Gabriela
González Herrera

3. Datos del sinodal 1
Doctora
Liliana
Carmona
Aparicio

4. Datos del sinodal 2
Doctora
Sandra Margarita
Morales
Mulia

5. Datos del sinodal 3
Doctor
Jorge Humberto
Limón
Pacheco

6. Datos del sinodal 4
Doctor
René de Jesús
Cárdenas
Vázquez

7. Datos del trabajo escrito
Efecto de la metformina sobre las terminales
nerviosas del cerebro de rata en un modelo
agudo de daño por estrés oxidativo.
55 p
2019

*A mi familia:
Iris, Rubi, Alma, Aleck y Lia*

I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	1
2.1. DIABETES MELLITUS	
2.1.1 Definición de Diabetes.....	1
2.1.2 Clasificación de la Diabetes.....	2
2.1.3 Síntomas y complicaciones.....	3
2.1.4 Epidemiología en México y a nivel mundial.....	4
2.1.5 Tratamiento.....	7
2.2 DETERIORO COGNITIVO ASOCIADO A DIABETES	
2.2.1 Deterioro cognitivo asociado a la Diabetes	7
2.2.2 Mecanismos involucrados en el deterioro cognitivo.....	8
2.2.3 Vulnerabilidad del tejido cerebral al daño por estrés oxidante.....	10
2.2.4 Estrés oxidante.....	10
2.2.5 Radicales libres y Especies Reactivas de Oxígeno y Nitrógeno.....	11
2.2.6 Producción de Especies Reactivas de Oxígeno en condiciones de hiperglicemia.....	11
2.2.6.1 Metabolismo de la glucosa.....	12
2.2.6.2 Autooxidación de la glucosa.....	13
2.2.6.3 Formación y acumulación de especies de glicación avanzada (AGES).....	14
2.2.6.4 Vía de los polioles.....	14
2.2.7 Efectos del estrés oxidante sobre la célula.....	15

2.2.7.1 Peroxidación de lípidos.....	15
2.3 METFORMINA	
2.3.1 Características generales de la metformina.....	18
2.3.2 Farmacocinética.....	18
2.3.3 Mecanismo de acción de la metformina.....	19
2.3.4 Efecto de la metformina sobre el sistema nervioso central.....	20
2.4 SINAPSIS	
2.4.1 Definición de sinapsis.....	23
2.4.1.1 Vesículas sinápticas.....	24
2.4.1.2 Sinaptofisina.....	24
2.5 MODELO DE ESTUDIO	
2.5.1 Sinaptosomas.....	24
2.5.2 Estrés oxidante inducido por cobre.....	25
III. JUSTIFICACIÓN.....	26
IV. HIPÓTESIS.....	27
V. OBJETIVOS.....	27
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	
6.1 Material biológico.....	27
6.1.1 Obtención de la fracción sinaptosomal.....	28
6.2 Reactivos.....	28
6.3 Diseño experimental.....	29
6.3.1 Lavado de sinaptosomas.....	29
6.3.2 Curva concentración-efecto de sinaptosomas tratados con CuSO ₄	29

6.3.3 Tratamiento de sinaptosomas con CuSO ₄ y metformina.....	29
6. 4 Evaluación del efecto del sulfato de cobre y metformina sobre los sinaptosomas.....	30
6.4.1 Función mitocondrial.....	30
6.4.2 Capacidad antioxidante total por medio de la prueba de Poder Antioxidante por Reducción del Hierro (FRAP).....	31
6.4.3 Poder reductor de la metformina.....	31
6.4.4 Precipitación de proteínas.....	32
6.4.5 Método de Slot-Blot para inmunodetección de 4-HNE y sinaptofisina.....	32
6.5 Análisis estadístico.....	33
VII RESULTADOS	
7.1 Determinación de la curva concentración-efecto de CuSO ₄ sobre la función mitocondrial de sinaptosomas.....	33
7.2 Efecto de la metformina sobre la función mitocondrial de sinaptosomas bajo estrés oxidante	34
7.3 Poder antioxidante de sinaptosomas pre- y postratados con metformina ante daño con CuSO ₄	36
7.4 Poder reductor de la metformina.....	37
7.5.1 Detección de 4-HNE como marcador de peroxidación de lípidos.....	39
7.5.2 Detección de la proteína sinaptofisina como marcador de la integridad de las vesículas sinápticas.....	40
VIII. DISCUSIÓN.....	42
IX. CONCLUSIONES.....	46

X. PERSPECTIVAS.....	46
XI. REFERENCIAS.....	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Criterios de diagnóstico de la Diabetes Mellitus.....	2
Tabla II. Efectos de la metformina sobre el sistema nervioso central.....	21
Tabla III. Tratamiento de sinaptosomas con CuSO ₄ y metformina.....	30
Tabla IV. Anticuerpos utilizados para la detección de 4-HNE y sinaptofisina... ..	33
Tabla V. Valores obtenidos en las distintas pruebas realizadas en los sinaptosomas de rata tratados con CUSO ₄ y metformina.	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Síntomas y complicaciones de la Diabetes Mellitus.....	5
Figura 2. Reporte anual de nuevos casos de DMT2 diagnosticados en México en el lapso de 1984-2015.....	6
Figura 3. Reacción de Fenton y Haber-Weiss.....	13
Figura 4. Proceso de peroxidación de lípidos.....	17
Figura 5. Estructura química de la metformina.....	18
Figura 6. Curva concentración-efecto del CuSO ₄ sobre la función mitocondrial de sinaptosomas de rata.....	34
Figura 7. Efecto de la metformina sobre la función mitocondrial de sinaptosomas de rata.	36
Figura 8. Capacidad antioxidante extracelular de sinaptosomas de rata tratados con metformina.....	37

Figura 9. Comparación del poder reductor de la metformina contra el ácido ascórbico.....	38
Figura 10a. Inmunodetección de 4-HNE en sinaptosomas de rata tratados con metformina.....	39
Figura 10b. Porcentaje de lipoperoxidación en sinaptosomas de rata tratados con metformina.....	40
Figura 11a. Inmunodetección de sinaptofisina en los sinaptosomas de rata tratados con metformina.....	41
Figura 11b. Cuantificación de los niveles de sinaptofisina en sinaptosomas de rata tratados con metformina.....	41

ABREVIATURAS

4-HNE	<i>4-Hidroxi-2-nonenal</i>
ADA	<i>Asociación Americana de Diabetes</i>
ADP	<i>Difosfato de Adenosina</i>
AF	<i>Acarreador de Fosfatos</i>
AGA	<i>Alteración de la Glucemia en Ayunas</i>
AGE	<i>Productos de Glicosilación Avanzada</i>
ALT	<i>Alanino Amino Transferasa</i>
ATG	<i>Alteración de la Tolerancia a la Glucosa</i>
AMPK	<i>Proteína Cinasa Dependiente de AMPc</i>
ATP	<i>Trifosfato de Adenosina</i>
Aβ	<i>Péptido Beta Amiloide</i>
CAD	<i>Cetoacidosis Diabética</i>
CAT	<i>Catalasa</i>
CuSO₄	<i>Sulfato de Cobre</i>
DM	<i>Diabetes Mellitus</i>
DME	<i>Diabetes Mellitus en el Embarazo</i>
DMG	<i>Diabetes Mellitus Gestacional</i>
DMT1	<i>Diabetes Mellitus tipo 1</i>
DMT2	<i>Diabetes Mellitus tipo 2</i>
EA	<i>Enfermedad de Alzheimer</i>
EHH	<i>Estado Hiperosmolar Hiperglucémico</i>
EOx	<i>Estrés Oxidante</i>
ER	<i>Retículo Endoplásmico</i>
RNS	<i>Especies Reactivas de Nitrógeno</i>
ROS	<i>Especies Reactivas de Oxígeno</i>
ETC	<i>Cadena Transportadora de Electrones</i>
FeSO₄	<i>Sulfato Ferroso</i>

FID	<i>Federación Internacional de Diabetes</i>
FRAP	<i>Poder Antioxidante por Reducción del Fierro (Ferric reducing/Antioxidant Power)</i>
GLU	
GSH	<i>Glucosa</i>
GSR	<i>Glutación Reducido</i>
GSSG	<i>Glutación Reductasa</i>
H₂O₂	<i>Glutación disulfuro reductasa</i>
HEPES	<i>Peróxido de Hidrógeno</i>
IDE	<i>Ácido hidroxietil-piperazineetano-sulfónico</i>
INEGI	<i>Enzima Degradadora de Insulina</i>
INS	<i>Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática</i>
IRM	<i>Insulina</i>
Jak/STAT	<i>Imagen de Resonancia Magnética</i>
LRP-1	<i>Tirosina Cinasa Janus/Señal Traductora y Activadora de Transcripción</i>
MAPK	<i>Lipoproteína de baja densidad relacionada al receptor de la proteína 1</i>
MDA	<i>Proteínas Cinasas Activadas por Mitógenos</i>
MnSOD	<i>Malonaldehído</i>
NAD⁺	<i>Superóxido Dismutasa dependiente de Manganeseo</i>
NADH	<i>Dinucleótido de Nicotinamida Adenina Oxidado</i>
NADP⁺	<i>Dinucleótido de Nicotinamida Adenina Reducido</i>
NADPH	<i>Dinucleótido de Nicotinamida Adenina Fosfato Oxidado</i>
NFκB	<i>Dinucleótido de Nicotinamida Adenina Fosfato Reducido/Factor Nuclear</i>
NH₂	<i>Potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas</i>
NO	<i>Grupo Amino</i>
NOS	<i>Óxido Nítrico</i>
O₂⁻	<i>Sintasa de Óxido Nítrico</i>
OCTs	<i>Radical superóxido</i>
•OH	<i>Transportadores de Cationes Orgánicos</i>
OMS	<i>Radical Hidroxilo</i>

ONOO[•]	<i>Organización Mundial de la Salud</i>
P	<i>Radical Peroxinitrilo</i>
PD	<i>Fosfato</i>
Pi	<i>Proteínas Desacoplantes</i>
PKC	<i>Fosfato Inorgánico</i>
RAGE	<i>Proteína Cinasa C</i>
RL	<i>Receptores de los Productos de Glicosilación Avanzada</i>
SH	<i>Radicales libres</i>
SINAIS	<i>Grupo Tiol</i>
SN	<i>Sistema Nacional de Información en Salud</i>
SNC	<i>Sistema Nervioso</i>
SOD	<i>Sistema Nervioso Central</i>
STZ	<i>Superóxido Dismutasa</i>
SYP	<i>Streptozotocina</i>
TCA	<i>Sinaptofisina</i>
TH	<i>Ciclo de Ácidos Tricarboxílicos</i>
TNFα	<i>Transhidrogenasa</i>
TPTZ	<i>Factor de Necrosis Tumoral α</i>
$\Delta\Psi_m$	<i>2,4,6- tripiridil-s-triazina</i>
PTEN	<i>Potencial de Membrana Mitocodrial</i> <i>Homólogo de fosfatasa y tensina</i>

I. RESUMEN

La Diabetes Mellitus es una enfermedad caracterizada por hiperglicemia crónica que afecta a varios órganos y tejidos; el estrés oxidante derivado de la hiperglucemia es uno de los factores involucrados en el desarrollo de las complicaciones de la enfermedad. El cerebro es uno de los órganos con mayor vulnerabilidad al estrés oxidante y múltiples estudios han asociado a la Diabetes Mellitus tipo 2 con la incidencia de enfermedades como Alzheimer e impedimento cognitivo. La metformina es el fármaco que se utiliza con mayor frecuencia en el tratamiento de la Diabetes Mellitus tipo 2 ya que presenta múltiples efectos benéficos; sin embargo, diversos estudios la relacionan con el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer promoviendo la aparición y acumulación del péptido beta-amiloide y del estrés oxidante. Por medio de ensayos de función mitocondrial, FRAP, poder reductor de hierro, así como inmunodetección de productos de peroxidación de lípidos y sinaptofisina se caracterizó la respuesta de sinaptosomas con daño oxidante inducido con CuSO_4 ante la metformina; los resultados muestran que la metformina disminuye el efecto oxidante del CuSO_4 sobre la función mitocondrial, aunque no se encontraron diferencias significativas en la peroxidación de lípidos ni en la cantidad de la proteína sinaptofisina presentes en los sinaptosomas, se demostró que el fármaco no es un agente reductor por lo que el efecto sobre la mitocondria involucraría un mecanismo

distinto. II. INTRODUCCIÓN

2.1 DIABETES MELLITUS

2.1.1 Definición de Diabetes

La Diabetes Mellitus (DM) es una enfermedad crónica-degenerativa considerada como una de las de mayor incidencia a nivel mundial. La Organización Mundial de la Salud (OMS) la define como un desorden metabólico de origen endocrino con múltiples etiologías cuya característica principal es la hiperglucemia crónica con subsecuentes alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas, como resultado de un defecto en la secreción y/o acción de la insulina (OMS, 1999; 2016a), hormona producida en el páncreas cuya principal función consiste en regular el transporte de glucosa del torrente sanguíneo a las células (Federación Internacional de Diabetes, 2017).

2.1.2 Clasificación de la Diabetes

Se consideran valores normales de glucemia en ayunas, los menores a 100 mg/dL y de 140 mg/dL después de 2 horas de una carga de glucosa de 75 gramos. Cuando el nivel de glucemia se encuentra por encima del rango normal pero no alcanza los umbrales de diagnóstico de diabetes se denomina hiperglucemia intermedia o prediabetes, caracterizada por el descenso en la sensibilidad a la insulina o aumento de la resistencia a la hormona (Tabla1) (FID 2017; Rojas, Molina & Cruz, 2012).

Tabla I. Criterios de diagnóstico de la Diabetes Mellitus. Tomada de Federación Internacional de Diabetes, 2017.

Se diagnostica Diabetes cuando se cumplen uno o más de los siguientes criterios:	Se diagnostica alteración de la tolerancia a la glucosa (ATG) cuando se cumplen ambos criterios:	Se diagnostica alteración de la glucemia en ayunas (AGA) cuando se cumplen ambos criterios
Glucosa en plasma en ayunas > 7.0 mmol/L (126 mg/dl)	Glucosa en plasma en ayunas <7.0 mmol/L (126 mg/dl)	Glucosa en plasma en ayunas 6.1-6.9 mmol/L (110-125 mg/dL).
Glucosa en plasma mayor a 140 mg/dl tras dos horas de haber ingerido por vía oral una carga de glucosa de 75 g.	La glucosa en plasma tras dos horas de haber ingerido por vía oral una carga de glucosa de 75g es de 7.8-11.1 mmol/L (140-200 mg/dl).	La glucosa en plasma tras dos horas de haber ingerido por vía oral una carga de glucosa de 75 g es <7.8 mmol/L (140 mg/dL).
El nivel de glucosa al azar >11.1 mmol/L (200 mg/dL) o la HbA1c > 48 mmol/mol (equivalente a 6.5%)		

La Federación Internacional de Diabetes (2017) ha definido tres tipos principales de Diabetes: Diabetes Mellitus tipo 1, Diabetes Mellitus tipo 2 y Diabetes Mellitus Gestacional. Otros tipos de diabetes menos frecuentes son la diabetes monogénica y la secundaria (FID, 2017).

1) Diabetes Mellitus tipo 1 (DMT1) o insulino dependiente: se presenta como resultado de una reacción autoinmune en la que el sistema inmune destruye a las células β del páncreas dando como resultado la deficiencia relativa o absoluta de insulina (Rojas *et al.*, 2012). Normalmente se presenta en niños y adolescentes que necesitan la administración de insulina diariamente con el fin de mantener la glucosa en concentración adecuada. Este tipo de diabetes representa el 5-10% de los enfermos a nivel mundial (FID, 2017).

2) Diabetes Mellitus tipo 2 (DMT2) o no insulino dependiente: en este caso, el páncreas produce la insulina, sin embargo, el cuerpo desarrolla cierta resistencia a la acción de la hormona como resultado de alteraciones en la respuesta celular posterior a la unión de la misma con su receptor y, en casos menos frecuentes, alteraciones en el receptor (Díaz-

Flores *et al.*, 2004). Durante la resistencia a la insulina, aumenta la producción de ésta (hiperinsulinemia) con el fin de disminuir el nivel de glucosa, sin embargo, con el tiempo se pueden presentar defectos en la secreción de la hormona. La DM2 es el tipo más común de diabetes y representa el 90-95 % de los casos, normalmente se asocia a obesidad o incremento en la grasa visceral y aparece con mayor frecuencia en adultos (Asociación Americana de Diabetes, 2010), sin embargo, la incidencia en niños, adolescentes y jóvenes adultos ha ido en aumento debido al incremento en la obesidad, sedentarismo y deficiencias en la dieta (FID, 2017).

3) La Diabetes Mellitus Gestacional: es una condición temporal que se caracteriza debido a que la detección de hiperglucemia se realiza por primera vez en cualquier momento del embarazo; se clasifica como: **a) Diabetes Mellitus Gestacional (DMG)**, caracterizada por un nivel de glucosa ligeramente elevado y **b) Diabetes Mellitus en el Embarazo (DME)** en donde el nivel de glucosa en sangre se encuentra bastante elevado. La mayoría de los casos (75-90%) de hiperglucemia diagnosticados durante el embarazo son DMG, esta afección es resultado de la resistencia a la insulina debido a la producción de hormonas como estrógeno, cortisol y lactógeno en la placenta, es transitoria y suele desaparecer al finalizar éste. Las mujeres diagnosticadas con DMG son propensas a presentarla nuevamente en un siguiente embarazo y tanto madre como hijo pueden desarrollar DM2 en el futuro (FID, 2017).

2.1.3 Síntomas y complicaciones

Los síntomas de la DM son múltiples, entre los más comunes se encuentran: poliuria, polifagia, polidipsia y pérdida de peso sin causa aparente (Moreno-Altamirano & Limón - Cruz 2009; OMS, 1999). La DM provoca disfunción y falla de órganos y sistemas, siendo el principal factor de riesgo la concentración elevada de glucosa en el torrente sanguíneo, por ello, las primeras complicaciones crónicas de esta enfermedad son resultados de las reacciones químicas y de la activación o alteración del metabolismo causado por el exceso de glucosa (Díaz-Flores *et.al.*, 2004); estas alteraciones pueden incapacitar y poner en riesgo la vida de los enfermos (FID, 2017). Las complicaciones diabéticas pueden dividirse en crónicas y agudas, las complicaciones crónicas más frecuentes de la hiperglucemia son: aterosclerosis de grandes vasos sanguíneos miocárdicos (infartos), cerebrales (accidente cerebrovascular) y periféricos (riesgo de amputación de miembros inferiores), así como complicaciones en los pequeños vasos que dan lugar a retinopatías, neuropatías y nefropatías (Figura 1) (De Fronzo, 2009, Moreno-Altamirano & Limón- Cruz, 2009). Las

complicaciones macrovasculares son las más comunes en la DMT2 y representa una de las principales causas de muerte en el paciente diabético; estudios previos muestran que el riesgo de padecer infartos al miocardio aumentan con cualquier incremento de la glucemia por encima del rango normal, mientras que las complicaciones microvasculares ocurren solo con concentraciones de glucemia extremas, el daño renal, a la retina y neurológico se asocian con niveles posprandiales superiores a 11 mM y pueden iniciar cinco o diez años después de manifestarse en enfermedad (Stratton, 2000).

Por otro lado, las complicaciones agudas incluyen hipoglucemia, cetoacidosis diabética (CAD), estado hiperosmolar hiperglucémico (EHH), coma diabético hiperglucémico, convulsiones o pérdida de conciencia, infecciones e incluso la muerte (Arnold, 2012; FID, 2017; OMS, 2016a). Por otra parte, la DMG incrementa el riesgo de pérdida fetal, malformaciones congénitas, muerte perinatal, complicaciones obstétricas, además de aumento en la morbilidad y mortalidad tanto para madre como para hijo (OMS, 2016 a). La DM ha sido asociada con el desarrollo de tipos específicos de cáncer y un incremento en discapacidades físicas y cognitivas, tuberculosis y depresión (Wong *et al.*, 2013).

2.1.4 Epidemiología en México y a nivel mundial

En el 2017 la Federación Internacional de Diabetes (FID) estimó en 425 millones el número de personas con DM, esta cifra representa el 8.8 % de la población a nivel mundial; datos de la OMS indican que en 2017 la hiperglucemia constituyó el tercer factor de riesgo para la mortalidad prematura, con 5 millones de decesos reportados por esta causa. Las proyecciones de la FID para el año 2045 son de 629 millones de personas con DM equivalentes al 10.4 % de la población (de 20-79 años) (FID, 2017; OMS, 2016a), para realizar estas estimaciones se han utilizado las proyecciones de población de la División de Población de Naciones Unidas. Estas proyecciones asumen que la prevalencia de diabetes no cambia dentro de cada grupo de edad, pero tiene en cuenta los cambios de la estructura de la población según la edad y los índices de urbanización (Organización de las Naciones Unidas, 2014)

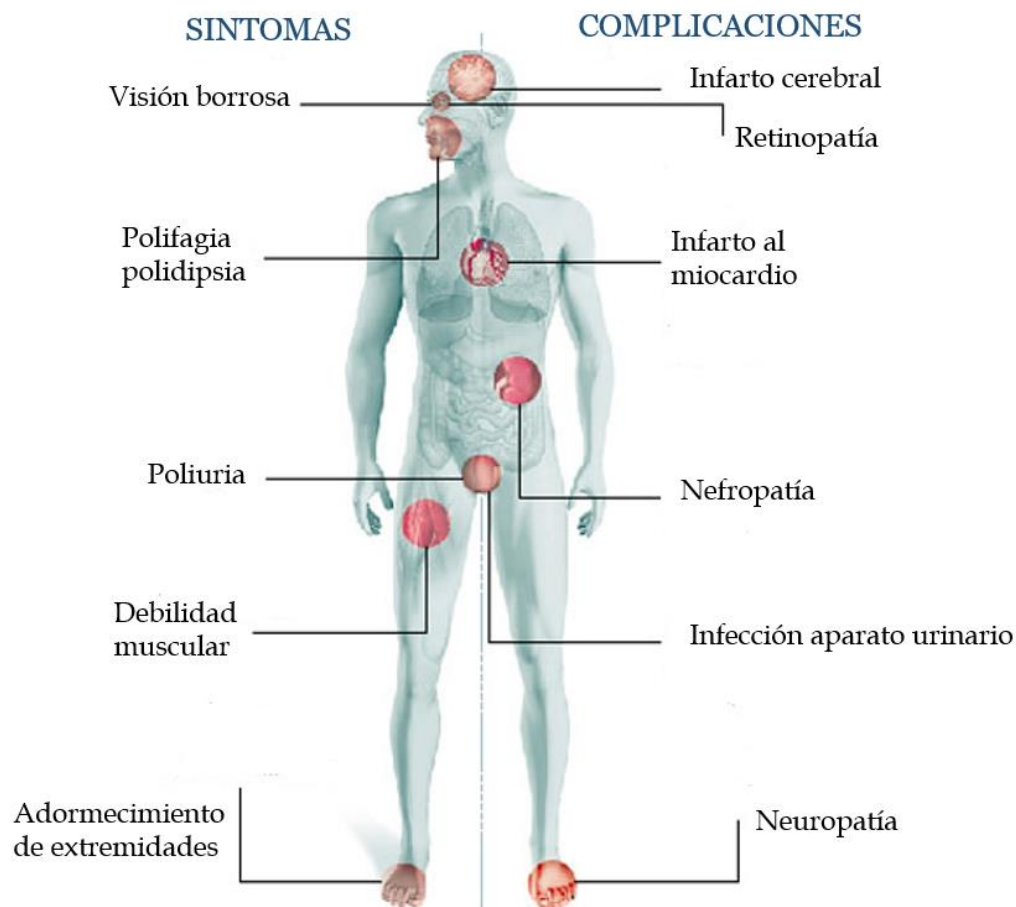


Figura 1. Síntomas y complicaciones de la diabetes mellitus. Modificado de www.centroantidiabetico.com/blog/tag/complicaciones-cronicas-de-la-diabetes-tipo-2/

Con 12 millones de pacientes con DM, según informes de la FID (2017), México ocupa el quinto lugar en la prevalencia de este padecimiento después de China, India, Estados Unidos y Brasil. La incidencia de esta enfermedad en la población mexicana se ha incrementado notablemente en las últimas décadas (Figura 2); desde el año 2003 se han reportado aproximadamente 400 000 casos nuevos de DM al año y, en el año 2012, ésta cifra representó el 0.4 % de la población mexicana. Los reportes de la FID indican que en el 2013 existían 8.7 millones de personas con DM2 en nuestro país y la prevalencia en personas de 20-79 años era del 11.77% (Moreno-Altamirano *et al.*, 2014). Si la incidencia de la enfermedad sigue aumentando, se espera que para el año 2045 México sea el cuarto país con mayor incidencia de DM, con 21.8 millones de pacientes con este padecimiento (FID, 2017).

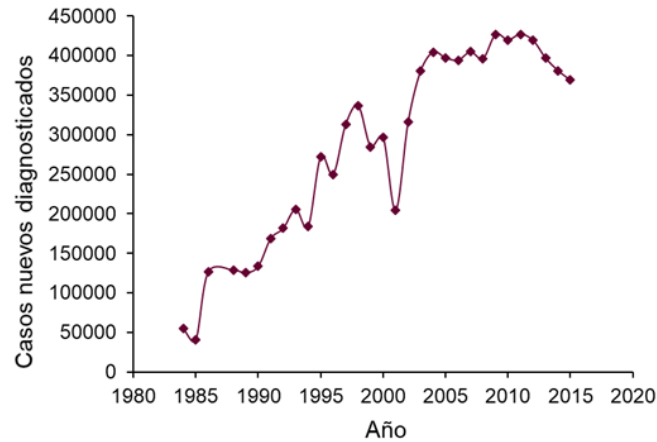


Figura 2. Reporte anual de nuevos casos de DM2 diagnosticados en México en el lapso de 1984-2015. Modificada de Altamirano *et al.* 2014.

La mortalidad asociada a la DM2 se ha incrementado de forma significativa durante las últimas décadas, en la década de 1990 la tasa de mortalidad por cada 100 000 habitantes se encontraba en 29.6 para la población general y en el 2011 ésta se incrementó a 69.9% con 80 788 defunciones, lo que representa un incremento del 136%, un año después esta tasa se encontraba en 72.66% con 85 055 muertes. De acuerdo con el Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS) desde el año 2000 a la DM2 es considerada como la primera causa de muerte en la población, sin embargo, la OMS (2016b) y el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) la declaran como la segunda y tercera causa, respectivamente, después de las enfermedades del corazón y de los tumores malignos (Moreno-Altamirano *et al.* 2014).

La DM ha sido considerada como la primera causa de ceguera adquirida en edad productiva en la población mexicana, así como la primera causa de amputaciones no traumáticas de miembros inferiores y de insuficiencia renal crónica (Dirección General de Información en Salud de la SSA, 2005); además, reduce la esperanza de vida de los pacientes en promedio 10 años; en el año 2010 se reportó que la edad promedio de las personas fallecidas a causa de la DM fue de 66.7 años (Hernández-Ávila, Gutiérrez & Reynoso-Noverón, 2013).

2.1.5 Tratamiento

De las personas diagnosticadas con DMT2 que están bajo tratamiento, la mayoría (84.81%) recibe agentes antidiabéticos orales, 6.79 % se tratan únicamente con insulina y solo el 2.46% recibe tratamiento combinado de antidiabético oral e insulina (Villalpando *et al.*, 2010).

Los fármacos orales utilizados en monoterapia para el tratamiento de la DMT2 van dirigidos a la corrección de una o varias alteraciones metabólicas presentes en la enfermedad. Según su mecanismo de acción son clasificados en: sensibilizadores, secretagogos, inhibidores de la α -glucosidasa, péptidos e inhibidores de la dipeptil peptidasa 4 (Mujica, 2016). Según la Asociación Americana de Diabetes (ADA por sus siglas en inglés; 2010), la metformina es el fármaco de primera elección en los pacientes con DMT2 salvo intolerancia o contraindicación. Este fármaco actúa como sensibilizador de los tejidos a insulina, actualmente se encuentra prescrita a más de 150 millones de personas a nivel mundial (Mujica, 2016).

2.2 DETERIORO COGNITIVO ASOCIADO A DIABETES

2.2.1 Deterioro cognitivo asociado a la diabetes

Desde el año 1922 se ha reconocido que la DM puede conducir al deterioro cognitivo, desde entonces, varios estudios en modelos experimentales y clínicos muestran alteraciones electrofisiológicas, en la neurotransmisión, anormalidades estructurales en el cerebro, así como disfunción cognitiva y riesgo de padecer depresión (Biessels *et al.*, 1994). En el 2006, Mijinhout y colaboradores sugirieron el término “*deterioro cognitivo asociado a la diabetes*” para describir un estado de leve a moderado en el deterioro cognitivo, principalmente realentización psicomotora y reducción de la flexibilidad mental que no es atribuible a otras causas (Mijinhout *et al.*, 2006).

Múltiples estudios muestran que la hiperglicemia es seguida por una lenta y progresiva anormalidad funcional en el cerebro (Arvanitakis *et al.*, 2004; Duarte *et al.*, 2013; Nelson 2009). Se ha demostrado que las personas con DM presentan déficits cognitivos asociados con la reducción del desarrollo de múltiples dominios de función cognitiva. En el estudio llevado a cabo por Monette *et al.* (2014) los pacientes diabéticos mostraron alteraciones en diferentes áreas, una de las más afectadas fue la velocidad de procesamiento de la información, con mayor alteración en las tareas motoras respecto a las verbales. Además de esto Sommerfield *et al.* (2004) encontró alteraciones en el proceso de la información

rápida, memoria de trabajo y en aspectos de atención en pacientes con DM. Estas deficiencias han sido asociadas con los cambios en la plasticidad sináptica del hipocampo (Biesseld, 1998).

Por medio de imágenes de resonancia magnética (IRM) se han observado cambios en la estructura cerebral de sujetos con DM2, estos presentan el hipocampo y la amígdala atrofiados en comparación con sujetos control (den Heijer *et al.*, 2003), además de inflamación y daño en tejidos periféricos, así como alteraciones en la corteza cerebral y cambios circulatorios en la sustancia blanca profunda del cerebro (Tiehuis *et al.*, 2008).

La DM es considerada como un factor de riesgo para desarrollar la enfermedad de Alzheimer (EA) (Butterfield, Domenico & Barone, 2014) puesto que los pacientes con DM tienen un 50-100% de mayor probabilidad de desarrollar este padecimiento que las personas sanas (Ott, 1999; Peila, Rodríguez & Launer, 2002).

2.2.2 Mecanismos involucrados en el deterioro cognitivo

Hasta la fecha, no se ha podido determinar la causa del deterioro cognitivo durante la DM, múltiples factores podrían estar involucrados en la patogénesis de la disfunción cerebral tales como los episodios de hipoglucemia, alteraciones cerebrovasculares, el papel de la insulina en el cerebro y los mecanismos de daño inducidos por hiperglucemia (Brands, Bell & Gibson); a nivel celular, esta enfermedad se ha asociado con disfunción mitocondrial, estrés del retículo endoplásmico, inflamación y metabolismo energético alterado, que causan anormalidades funcionales tanto en las neuronas como en las células de la glía, provocando muerte neuronal (Lin, 2006; Lindholm *et al.*, 2006; Kalaria, 2009). Para explicar el deterioro cognitivo se han propuesto dos mecanismos patogénicos: **1) origen vascular** y **2) origen no-vascular**. Este último ligado al metabolismo del péptido β -amiloide ($A\beta$) y proteínas tau. El $A\beta$ se origina a partir de la proteína precursora amiloide, tiene una solubilidad limitada y forma autoagregados que constituyen fibrillas insolubles, las cuales son tóxicas para las neuronas. Por otra parte, la proteína Tau forma parte de una familia de proteínas asociadas a microtúbulos, por lo que es fundamental en el mantenimiento de la estabilidad del citoesqueleto neuronal (García & Jay, 2004).

En el mecanismo patogénico de origen vascular, la DM es considerada como un factor de riesgo al aumentar la incidencia de infartos y microinfartos que causan demencia vascular además de disminuir el umbral de acumulación necesario del péptido $A\beta$ para producir

deterioro cognitivo. Por otro lado, el origen no-vascular se explica por la hiperinsulinemia ya que se han determinado múltiples mecanismos que relacionan a la insulina con la cascada fisiopatológica del depósito del péptido A β :

a) La enzima degradadora de insulina (IDE) se encuentra relacionada con la eliminación de A β , por lo que el aumento de la insulina disminuiría la eliminación del péptido A β .

b) Al aumentar la insulina en tejidos periféricos, la barrera hematoencefálica disminuye el paso de esta hormona al interior del cerebro, esto trae como consecuencia la disminución de IDE que conlleva al aumento de A β .

c) La insulina podría aumentar la fosforilación de la proteína Tau, esta modificación postraduccional provoca la pérdida de las funciones fisiológicas de la proteína, conllevando a alteraciones del citoesqueleto.

d) El aumento de los productos finales de glicación avanzada (AGEs) que consisten en la unión de azúcares no reductores a los grupos amino de las proteínas, produce la sobreexpresión de sus receptores (RAGEs), se sabe que la unión de los AGEs a sus receptores está involucrada, entre otros mecanismos, en la producción de estrés oxidante.

e) Se ha visto un aumento de A β cerebral debido a un déficit en su eliminación, la cual es mediada por la LRP-1 un miembro de la familia de receptores de lipoproteínas que se encuentra disminuido en sujetos con DMT2 (Luchsinger, 2012).

Por otro lado, algunos autores han descrito que la disfunción cerebral durante la diabetes se relaciona con la muerte celular por estrés oxidante (anteriormente referenciado como estrés oxidativo) mediado por radicales libres, la hiperglicemia crónica tiene como consecuencia la alteración de la cadena transportadora de electrones al aumentar la producción de radicales libres y disminución del poder antioxidante (Stewart & Liolitsa 1999; Magistretti & Pellerin, 1996); de este modo, las células se ven sometidas a estrés oxidante y disfunción mitocondrial, con alteraciones en el potencial redox provocando la activación de genes sensibles al potencial y cuyas consecuencias son la inflamación, defectos en autofagia, necrosis neuronal y apoptosis (Muriach *et al.*, 2014). La apoptosis inducida por estrés oxidativo se ha relacionado con la inhibición de la neurogénesis (Cui, Zuo & Zhang, 2006).

Cardoso *et al.* (2013) demostraron que las mitocondrias del hipocampo de ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina (STZ) presentan niveles más altos de malonaldehído (MDA), aumento de la actividad de la enzima glutatión disulfuro reductasa (GSSG) y baja actividad de la superóxido dismutasa dependiente de magnesio (MnSOD), también encontraron alteraciones en la fosforilación oxidativa caracterizadas por la disminución del potencial mitocondrial así como en los niveles de ATP y mayor fase de retardo de la repolarización, estas evidencias señalan a las especies reactivas de oxígeno (EROs) como elementos clave en procesos neurodegenerativos y en el desarrollo de las complicaciones tardías de la DM (Moreira, 2009; Salinas *et al.*, 2013).

2.2.3 Vulnerabilidad del tejido cerebral al daño por estrés oxidante

El cerebro es una estructura pequeña, constituye el 2% del peso corporal, es un órgano con metabolismo muy activo, consume aproximadamente el 20% del oxígeno utilizado por el cuerpo y es el órgano que utiliza mayor energía; su metabolismo está basado únicamente en dos sustratos: la glucosa y el oxígeno (Jaramillo, 2013). La mayor parte de oxígeno que llega a las células neuronales se utiliza para la síntesis de moléculas de trifosfato de adenosina (ATP) necesarias para mantener la estabilidad neuronal. El 50-60% de la masa cerebral está constituida por fosfolípidos, colesterol y glicolípidos; de estos, los ácidos grasos poliinsaturados como fosfatidilcolina (40-50%), fosfatidiletanolamina (20-50%), fosfatidilserina (2-10%) son los de mayor abundancia en las membranas neuronales y les confieren estabilidad, fluidez y permeabilidad además de participar en múltiples eventos de señalización celular (Eyster, 2007); otra de las características distintivas del cerebro es la escasa cantidad de antioxidantes presentes. Estas características lo vuelven vulnerable al daño causado por estrés oxidante que promueve, entre otras cosas, la neurodegeneración y muerte cerebral (Cerdá, Borrego & Sáez, 2010).

2.2.4 Estrés oxidante

Bajo condiciones fisiológicas normales, existe un equilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno y los mecanismos antioxidantes, cuando este equilibrio se rompe las células se encuentran bajo estrés oxidante (EOx). Esta condición se caracteriza por la producción de radicales libres que sobrepasa la actividad de las enzimas antioxidantes y cuyas consecuencias se ven reflejadas en la homeostasis del organismo con daños a nivel celular, tisular y sistémico (Finkel & Holbrook 2000).

2.2.5 Radicales libres y Especies Reactivas de Oxígeno y Nitrógeno

Un radical libre (RL) se define como un átomo o molécula que presenta uno o más electrones no apareados en el último orbital (Halliwell & Gutteridge, 2006), condición que le confiere alta reactividad e inestabilidad por lo que tienden a estabilizarse tomando el electrón faltante de las moléculas adyacentes (Mc Cord, 2000; Johanse *et al.*, 2005). Los RL pueden formarse por la pérdida o ganancia de un único electrón desde un compuesto no radical o por el rompimiento de un enlace covalente en donde cada átomo retiene a uno de los electrones que formaban el enlace, reacción conocida como fisión homolítica. Los principales RL se producen continuamente durante la respiración aerobia en el metabolismo celular y se denominan especies reactivas de oxígeno (EROs). Generalmente, las EROs son producidas en la mitocondria al ocurrir una transferencia electrónica incompleta en el proceso de reducción del O_2 a H_2O (Ott *et al.*, 2007), en donde la reducción univalente del mismo origina superóxido; espontáneamente o por acción de la enzima dismutasa el superóxido se convierte en peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y O_{2y} , en presencia de algún ion metálico, los radicales superóxido y peróxido reaccionan para dar lugar al hidroxilo ($\cdot OH$), un radical muy reactivo y tóxico. Además de esto, el ion superóxido puede reaccionar con el óxido nítrico induciendo la formación de peroxinitrito ($ONOO^-$; Almaguer & Almaguer, 2006).

Las especies derivadas del nitrógeno se conocen como especies reactivas de nitrógeno (ERNs). Entre las ERNs se encuentran los radicales óxido nítrico ($NO\cdot$) y dióxido de nitrógeno (NO_2) y los no radicales como el ácido nitroso (HNO_2) y el peroxinitrito (Mc Cord, 2000).

2.2.6 Producción de especies reactivas de oxígeno en condiciones de hiperglucemia

La formación de EROs y el daño inducido por estrés oxidante en condiciones de hiperglucemia ocurre a través de múltiples vías bioquímicas y mecanismos de acción que producen metabolitos y productos de síntesis que afectan de manera negativa la función celular, en estas vías se incluyen: metabolismo de la glucosa, autooxidación de la glucosa, formación y acumulación de especies de glicación avanzada, metabolismo de la hexosamida y vía del sorbitol (Robertson, 2004). Además del incremento de las EROs se ha observado un declive en los metabolitos y enzimas antioxidantes como consecuencia de la disminución de NADPH y glutatión reducido, así como daño oxidante en las enzimas involucradas (Díaz-Flores *et al.*, 2004).

El mecanismo por el que actúan las EROs en las complicaciones de la DM se conoce parcialmente; se sabe que actúan por la modificación oxidativa de macromoléculas y por la activación del factor de transcripción NFκB que conduce a la expresión alterada de genes involucrados en la respuesta inflamatoria y apoptosis (Mohamed *et al.* 1999).

2.2.6.1 Metabolismo de la glucosa

La glucosa es la molécula principal que provee de energía a las células y la única en neuronas, su metabolismo se basa en la oxidación o pérdida de electrones que son transferidos a cofactores que se reducen (NADH + H⁺ y FADH₂) y posteriormente, por medio de reacciones de óxido-reducción, pasan por los complejos I, II, III y IV de la cadena respiratoria, se transfieren al oxígeno (O₂), lo reducen y se forma agua (H₂O). Durante el catabolismo de la glucosa, las EROs pueden formarse en las reacciones oxidativas de la glucólisis, en el ciclo de los ácidos tricarbónicos y en la cadena respiratoria; esta última presenta el potencial redox y la energía libre óptima para poder reducir parcialmente al oxígeno por lo que presenta mayor probabilidad de generarlas (Calderón *et al.* 2013). El radical superóxido (O₂^{•-}) se produce principalmente durante la transferencia de electrones del complejo I o II por medio de la coenzima Q al complejo III (Green, 2004). El radical [•]OH y el H₂O₂ se forman por reacciones cíclicas de óxido-reducción tales como la reacción de Fenton en donde un ion Fe²⁺ reacciona con el H₂O₂ para dar lugar al radical [•]OH, así como la reacción Haber-Weiss que resulta en la producción de Fe²⁺ cuando el ion férrico (Fe³⁺) reacciona con el H₂O₂ (Figura 3). Otros metales de transición que incluyen Cu, Ni, Co y V pueden ser responsables de la formación del radical [•]OH. Asimismo, una serie de oxidasas generan cantidades importantes de EROs entre estas se encuentran: NADPH y NADH oxidasas, xantina oxidasa y ciclooxigenasa; algunas otras enzimas como la sintasa de óxido nítrico (NOS) producen ERNs, el óxido nítrico (NO) puede reaccionar con O₂^{•-} para producir el radical peroxinitrilo (ONOO^{•-}) capaz de dañar lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Calderón, Salinas & Quintanar, 2013).

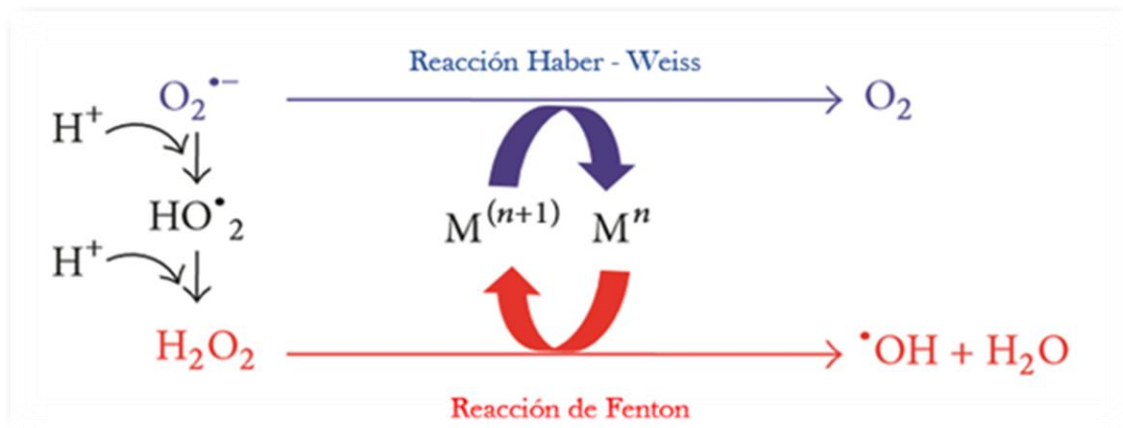


Figura 3. Reacción de Fenton y Haber-Weiss. La forma reducida de metales de transición (M^n) reacciona con el peróxido de hidrógeno para formar OH^\bullet en la reacción de Fenton. El radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) puede reaccionar con la forma oxidada de los metales de transición (M^{n+1}) para dar lugar a M^n que completará el ciclo de óxido-reducción en la reacción Haber-Weiss (Tomada de Ayala, Muñoz & Argüelles, 2014).

En condiciones fisiológicas, el incremento de la actividad metabólica va acompañada del incremento proporcional en la cantidad de EROs formadas, sin embargo, cuando la tasa metabólica incrementa por arriba de las condiciones fisiológicas, la formación de EROs se potencia, especialmente la producción de $O_2^{\bullet-}$, como consecuencia de la acumulación excesiva de protones en el espacio intermembranal (Calderon *et al.*, 213).

Durante la DMT2 la elevada concentración de glucosa que alimenta en exceso la cadena respiratoria provoca el incremento en el potencial protomotriz, sin embargo, no hay un uso proporcional de ATP, lo que impide regular el flujo de protones y da lugar al incremento en la producción de $O_2^{\bullet-}$; algunos autores consideran este fenómeno como la base para el aumento de las reacciones anabólicas que ocurre con frecuencia en pacientes diabéticos (Green *et al.*, 2004).

2.2.6.2 Auto-oxidación de la glucosa

En condiciones de hiperglucemia la glucosa es capaz de auto-oxidarse, con la oxidación del radical α -hidroxialdehído de la glucosa se forma un enediol que en presencia de metales de transición reacciona con oxígeno y una proteína para formar 1,4-dideoxiglucosona-proteína capaz de generar una oxidación en cadena que dará lugar a los productos de glicación avanzada (Yamagishi, 2011).

2.2.6.3 Formación y acumulación de especies de glicación avanzada (AGEs)

Durante la hiperglucemia crónica, la glucosa, fructosa, glucosa-6-fosfato y sus intermediarios interactúan con las proteínas, ácidos nucleicos y lípidos para formar productos de glicación avanzada (AGEs por sus siglas en inglés). Este proceso conocido como glicación, inicia con la interacción no enzimática de los grupos carboxilo de los carbohidratos y los grupos amino de las proteínas, principalmente con el amino terminal y el ϵ -amino de residuos de lisina, arginina e histidina dando origen a una base de Schiff, si la concentración de glucosa se mantiene elevada, la base de Schiff sufre un reordenamiento y da lugar a los productos tempranos de glicación, también llamados productos de Amadori o fructosamina, éstos sufren rearrreglos moleculares que incluyen reacciones de deshidratación, condensación, oxidación y ciclación para formar compuestos α -oxoaldehídos como la 3-desoxiglucosona, metilglioxal y el glioxal conocidos como precursores de los AGEs. Los α -oxoaldehídos son muy reactivos y al reaccionar con los centros catalíticos de una proteína forman puentes cruzados estables (Díaz-Flores *et al.*, 2004) que alteran irreversiblemente la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas haciendo que se agreguen y pierdan sus funciones biológicas (Olmos *et al.*, 2009; Ahmed, 2005). Además, los AGEs ejercen una acción sobre receptores específicos (RAGEs), en el cerebro se han encontrado dos isoformas uno de 23 kD y otra de 48 kD (Brett *et al.* 1993); las proteínas glicadas que se unen a estos receptores inducen diversos efectos como la producción de EROs, estado proinflamatorio, proliferación de células (macrófagos), activación de factores de transcripción, así como la expresión de diversos péptidos y proteínas (Thomalley, 1998).

2.2.6.4 Vía de los polioles

La vía metabólica de la glucosa depende de las necesidades energéticas de la célula, en el SNC, al igual que en el riñón, retina, cristalino y en el corazón que no requieren de insulina para la captación de glucosa, ésta se dirige a la vía del sorbitol también conocida como vía de los polioles. En esta vía, la aldosa reductasa es activada al detectar niveles elevados de glucosa lo que permite reducirla irreversiblemente en sorbitol a través de la oxidación del difosfato de nicotinamida adenina fosfato reducido (NADPH), que funciona como coenzima de la aldosa reductasa (Hodkinson, Sondergaard & Yang, 2001). La disminución de NADPH en este proceso afecta negativamente a enzimas que requieren esta coenzima, tales como la óxido nítrico sintasa (NOS), la glutatión reductasa (GSR), la catalasa y la NADPH oxidasa, algunas de las cuales participan en mecanismos antioxidantes, lo que

explicaría la eficiencia de estos sistemas en pacientes diabéticos que requieren de este sustrato (Díaz-Flores *et al.* 2004).

Por otra parte, la sorbitol deshidrogenasa cataliza la formación reversible de fructosa y NADH a partir del sorbitol, se dice que este es el punto de la vía que tiene repercusiones en las complicaciones diabéticas dada por la acumulación de los productos y la característica reversibilidad.

2.2.7 Efectos del estrés oxidante sobre la célula

El estrés oxidante induce en la célula efectos tóxicos debido a la oxidación de lípidos, proteínas, carbohidratos y nucleótidos, lo que provoca la acumulación de agregados intracelulares, disfunción mitocondrial, excitotoxicidad y apoptosis (Dorado, Rugerio & Rivas, 2003).

De manera general, el incremento de las EROs provoca un incremento en la actividad de la proteína cinasa C (PKC), que activa señales intracelulares de estrés metabólico y oxidante, caracterizado por incrementos en las actividades de NF- κ B, p38 MAPK, Jak/STAT, las cuales activan diferentes vías metabólicas, encienden genes y provocan una respuesta masiva y de largo plazo. La señalización intracelular de estrés induce el incremento de distintas citosinas como ET1, lo que conlleva a la activación de las enzimas NADPH y NADH oxidasas, provocando disminución del poder reductor y en la capacidad antioxidante total, y aumentando cíclicamente las concentraciones de EROs y de $O_2^{\cdot-}$ (Calderón, Muñoz & Quintanar, 2013).

2.2.7.1 Peroxidación de lípidos

Los fosfolípidos, glicolípidos y colesterol de las membranas neuronales contienen gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, vulnerables a la peroxidación dado que los dobles enlaces C=C debilitan la unión C-H del átomo de carbono vecino (Balderas & Méndez, 1998).

El proceso de peroxidación de lípidos consta de tres etapas: iniciación, propagación y terminación (figura 4). En el inicio, el prooxidante extrae el hidrógeno alílico formando el radical lípido; la molécula se estabiliza por medio de un reordenamiento para formar un dieno conjugado (paso 1). En la fase de propagación, el radical lípido reacciona rápidamente con el oxígeno para formar el radical lípido peroxilo (paso 2), cuando se extrae

un hidrógeno desde otra molécula lipídica genera un nuevo radical lipídico y un lípido hidroperoxidado (paso 3). En la reacción de termino, un antioxidante dona un átomo de hidrogeno al radical lípido peroxilo para formar un producto no-radical (paso 4; Yin, Xu & Porter, 2011).

Los productos de peroxidación de lípidos son el malondialdehído (MDA), propanal, hexanal y 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE). Los aldehídos derivados de la peroxidación lipídica generalmente son estables y pueden difundir libremente en la célula e incluso escapar de ella y atacar blancos alejados del sitio del evento original iniciados por los RL. Aunque el MDA se produce en mayor cantidad, el 4-HNE es considerado como uno de los productos más tóxicos generados durante la peroxidación de lípidos (Esterbauer, 1991); puede producirse a partir de ácido araquidónico, ácido linoleico o sus hidroperóxidos en concentraciones que van de los 10 μM a 5mM en respuesta al estrés oxidante; su toxicidad es consecuencia de la reacción con los grupos Thiol (SH) de residuos cisteína, lisina e histidina de las proteínas, originando un aducto estable de Michael con estructura hemiacetal y forma pirrol (Uchida & Earl, 1992; Schaur, 2003). El 4-HNE puede actuar como molécula de señalización o como producto citotóxico, sus efectos incluyen la inhibición de la síntesis de proteínas y del ácido desoxirribonucleico (DNA), inactivación de enzimas, estimulación de la fosfolipasa C, reducción de la comunicación *gap-junction* y estimulación de la migración de neutrófilos. Es considerado como el mejor marcador de peroxidación

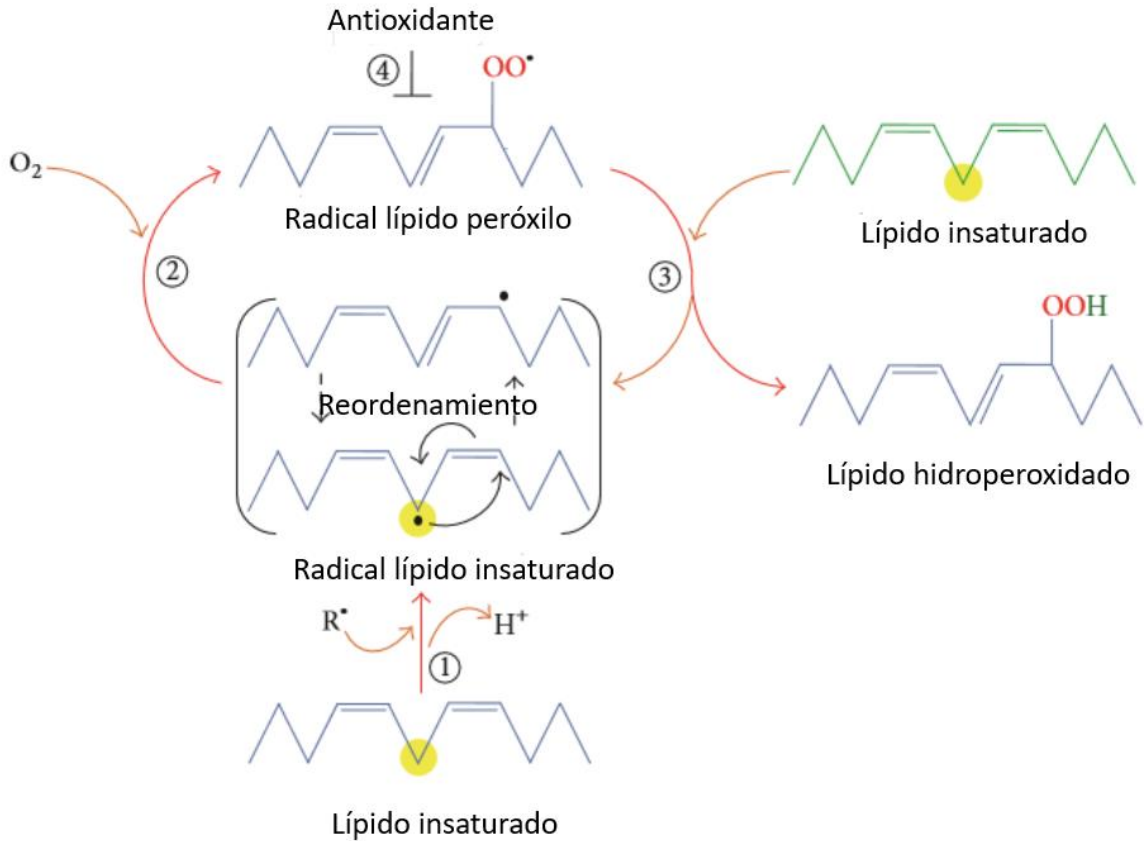


Figura 4. Proceso de peroxidación de lípidos. Tomada de Ayala, Muñoz & Arguelles, 2014.

lipídica y molécula de señalización involucrada en la regulación de varios factores de transcripción sensibles al estrés como el factor nuclear (Nrf2), activación de la proteína-1 (AP-1), NFkB y el receptor activado de proliferación peroxisomal (PPAR), además de proliferación y/o diferenciación celular, supervivencia celular, autofagia, senescencia, apoptosis y necrosis (Ayala *et al.*, 2014).

Las membranas que han sufrido de peroxidación de lípidos pierden fluidez, aumentan su permeabilidad y provocan la reducción del potencial electroquímico. El daño a las proteínas de membrana provoca que las funciones de sus canales se vean afectados y sean incapaces de preservar su integridad; además el radical $\cdot OH$, HNO_2 y $ONOO^-$ provocan nitración y desaminación en adenina, guanina y citocina cuya consecuencia es la alteración en la codificación y transcripción del material genético (Dorado *et al.*, 2003).

2.3 METFORMINA

2.3.1 Características generales de la metformina

La metformina (1,1-dimetil biguanida) es un fármaco antidiabético de administración oral que forma parte del grupo de las biguanidas procedentes de la isoprenilguanidina o galegina, un alcaloide derivado de la planta *Galega officinalis* (Bailey & Day, 2004). Las biguanidas fueron sintetizadas en 1920 por la unión de 2 guanidinas por medio de un nitrógeno y eliminación de un radical amino (Simó, 2002), comenzó a utilizarse clínicamente en el año de 1957 (Bailey 2004) y en la década de 1970 se difundió un amplio interés por el fármaco.

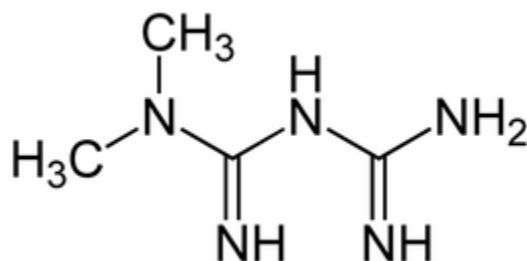


Figura 5. Estructura química de la metformina. Tomada de Logie et al., 2012.

La metformina es una molécula pequeña, con peso de 129.16 Da, anfótera con valor pKa de 2.8 y 11.5, hidrosoluble y baja liposolubilidad, poco permeable a las membranas celulares, bajo condiciones fisiológicas presenta forma protonada y carga positiva. El grupo guanidino de la metformina posee deslocalización de los electrones en la región cargada positivamente y puede formar pares iónicos estables con grupos cargados negativamente de la superficie celular, esta característica ha sido considerada como la responsable de la despolarización de las membranas celulares observada en hepatocitos, que abren los canales de cloruro al ser expuestos con el fármaco (Lutz, 2001); por otro lado, la cadena hidrocarbonada apolar le confiere lipofilidad que permite a la molécula unirse a los dominios lipídicos de las membranas celulares (Lutz *et al.*, 2001).

2.3.2 Farmacocinética

En la administración vía oral de 0.5-1.5 gramos de metformina en seres humanos sanos, un 50-60 % de la metformina se absorbe en el intestino delgado a través de los receptores de monoaminas de la membrana plasmática en un tiempo de 0.9 a 2.6 horas (Gong *et al.*, 2012), se distribuye rápidamente en tejidos periféricos y fluidos, no se une a proteínas

plasmáticas y no se metaboliza en el hígado. La vida media plasmática de la metformina oscila entre 1.5-4.9 horas y a las 12 horas de ingesta el 90 % se ha eliminado en la orina por secreción tubular (Hernández, 2011). Se requiere de transportadores de cationes orgánicos (OCTs) para pasar al espacio intracelular (Gong *et al.* 2012) y una vez en el interior, se acumula en la mitocondria; la afinidad hacia la mitocondria es explicada por dos características de la metformina mencionadas previamente: atracción del fármaco cargado positivamente hacia la mitocondria cargada negativamente como resultado de la acumulación de iones OH^- generados durante el transporte de electrones en la matriz (Owen *et al.*, 2007), y por otro lado, la interacción hidrófoba del fármaco con los fosfolípidos de la membrana mitocondrial (Viollet *et al.*, 2012).

2.3.3 Mecanismo de acción de la metformina

Aunque la metformina comenzó a utilizarse hace 70 años, el mecanismo de acción por el que actúa no se conoce completamente (Jiménez, 2016); actúa como antihiper glucemiante a nivel extrapancreático aumentando la sensibilidad a la insulina en tejidos hepáticos y periféricos sin causar hipoglucemia. En el hígado reduce la glucogenólisis y gluconeogénesis cuya activación en pacientes diabéticos puede alcanzar el 36% (Hundal *et al.*, 2000). En tejidos periféricos, especialmente a nivel del músculo, aumenta la captación y utilización tisular de la glucosa y retrasa la absorción intestinal de ésta (Zhang, 2011).

Se ha postulado que el blanco principal de la metformina es la mitocondria, dos grupos independientes de investigadores: Owen *et al.* (2000) y El-Mir *et al.* (2000) reportaron que este fármaco inhibe específicamente al complejo I de la cadena respiratoria, este efecto es bajo ($\approx 40\%$) comparado con la rotenona ($\approx 80\%$), sugiriendo que el sitio de acción de cada una difiere en una o varias subunidades del complejo I. Logie *et al.* (2012) han reportado que este efecto está relacionado con la capacidad de la metformina de formar complejos con el cobre, ya que cuando la metformina se expone al pH mitocondrial ésta se encuentra desprotonada, propiedad que le confiere la habilidad de unirse a los iones cobre y cuyos productos son los responsables de la inhibición del complejo. Se ha demostrado que la metformina impide la reducción de la coenzima Q, aceptor de los electrones provenientes del complejo I, probablemente por unirse a la interface hidrofílica-hidrofóbica de la membrana, atrapando a la enzima en una configuración de asa no activa; este fármaco también ejerce un efecto inhibitorio sobre la producción de EROs mitocondrial al bloquear selectivamente el flujo inverso de electrones a través de los complejos de la cadena respiratoria. El efecto de la metformina no se restringe a la mitocondria, se tienen reportes

de que este fármaco es capaz de afectar el metabolismo de eritrocitos, células que carecen de mitocondrias, mediante la modulación de la fluidez de la membrana (Muller, 1997).

Con la inhibición del complejo I de la cadena respiratoria, ocurre una reducción transitoria de energía, inicialmente se presenta una disminución en la oxidación del NADH, del paso de protones a través de la membrana interna de la mitocondria y del índice de consumo de oxígeno, lo que conlleva a la reducción del gradiente de protones y, por último, a la regulación de la síntesis de ATP a partir de ADP (Bridges *et al.*, 2014) y al aumento de AMP citosólico que activará a la proteína cinasa activada por AMP (AMPK por sus siglas en inglés). AMPK participa en la regulación del metabolismo de la glucosa y lípidos, sensa el estrés metabólico e integra las distintas señales patológicas para reestablecer el balance energético (Ronnelt *et al.*, 2009), además, actúa como regulador en la supervivencia o muerte celular en respuesta a hipoxia, estrés osmótico u oxidante (Hardie, 2003; Shin, Cho & Kim, 2009). AMPK es considerada como regulador metabólico durante condiciones energéticas anormales, siendo un punto de control esencial bajo estas condiciones (Sinnott & Brenman, 2014) por lo que representa un elemento importante en la hiperglicemia asociada a DMT2, neuroprotección, antiinflamación y estrés oxidante (Chakraborty, 2011).

2.3.4 Efecto de la metformina sobre el sistema nervioso central.

La metformina puede cruzar la barrera hematoencefálica y tiene efectos específicos en el SNC, aunque los sitios y mecanismos de acción aun no son conocidos. En modelos murinos la concentración máxima de metformina en el cerebro se ha encontrado después de 6 horas de la ingesta, en concentraciones similares a la del plasma (Labuzek, 2009; Nath, 2009). Se ha observado que la administración aguda y crónica (50 mg/Kg) de metformina, esta se acumula preferencialmente en cerebelo y glándula pituitaria, mientras que el cuerpo estriado presenta la menor acumulación en ambos esquemas (Wilcock & Bailey, 1994). La inflamación es un factor determinante en la distribución del fármaco, la glándula pituitaria es el tejido que presenta mayor concentración del fármaco en tratamientos agudos y crónicos en presencia de inflamación, el hipotálamo y cuerpo estriado presentan concentraciones significativamente mayores en presencia de inflamación que las encontradas en condiciones normales. La DM y aterosclerosis provocan inflamación de bajo grado, similar a las experimentales. Estos hallazgos son clave al explicar el efecto anorexigénico de la metformina en personas con trastornos metabólicos (Labuzek *et al.*, 2009) así como la función de este fármaco en la evolución de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer y atrofia.

Los efectos de la metformina han sido estudiados en múltiples modelos tanto *in vivo* como *in vitro* y bajo gran variedad de condiciones, sin embargo, los efectos del fármaco sobre el SNC y sus patologías tienen resultados no del todo esclarecidos. Algunos resultados sugieren que la metformina es capaz de potenciar la neurogénesis, mejorar el aprendizaje y reducir el decaimiento cognitivo, mientras que otros hallazgos demuestran que el uso del fármaco tiene consecuencias en el incremento de la incidencia de Alzheimer, disfunción cognitiva y una estrecha relación con la expresión y acumulación de A β (Tabla II).

Tabla II. Efectos de la metformina sobre el sistema nervioso central.

Efecto	
Perfil fosfoproteómico	Incrementa la fosforilación de proteínas relacionadas con metabolismo mitocondrial, chaperonas y adhesión celular. Efecto neuroprotector sobre la actividad de la α -sinucleína, reduce la actividad de ATPsintasa reduciendo fosforilación oxidativa, reprogramación y preacondicionamiento celular que minimiza la muerte celular por EROs, contribuye a la organización e integridad de la membrana (Khang, Park & Shin; 2014)
Neurogénesis y memoria espacial.	Sin efecto sobre la viabilidad celular, activa la vía α PKC-CBP que recluta precursores neurales en adultos e incrementa la función neural, potencia la neurogénesis tanto en cultivos de roedores como de humanos, promueve la neurogénesis en adultos, incrementando el número de neuronas en bulbo olfatorio e hipocampo y la memoria espacial se ve favorecida (Wang, et al. 2012).
Proliferación celular y diferenciación	Restaura la proliferación celular y diferenciación de neuroblastos en la zona subgranular del hipocampo afectadas por la diabetes (Koo <i>et al.</i> , 2010).
Parkinson	Protege contra la catalepsia inducida con haloperidol mediante el incremento en la concentración de las enzimas GSH y CAT, mejora la actividad de la enzima SOD, la peroxidación de lípidos y la producción de óxido nítrico es atenuada por el fármaco. Ratonés pre tratados con metformina presentan mejoras en la memoria a corto plazo y potencia el aprendizaje y memoria además de reducir la inmovilidad inducida por haloperidol (Halimah <i>et al.</i> ; 2013). Efectos similares encontrados con MPTP (Patil <i>et al.</i> , 2014).
Isquemia	Mejora los movimientos senso-motores después de un accidente cerebrovascular, indicando restauración de la plasticidad funcional y estructural; mejora el tono dopaminérgico (recuperación funcional), que ocurre después de un infarto, probablemente por la inducción de angiogénesis mediante la activación de AMPK y activación de VEGF (Venna <i>et al.</i> , 2014).
Lesión isquémica en ratas diabéticas.	Ratas tratadas con metformina reducen los niveles de estrés nitrosativo, reduce la activación de la caspasa-3, reduce el número de células apoptóticas, restauran la actividad de Akt y pP38 <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> (Abdelsaid <i>et al.</i> , 2015).
Alzheimer	Sin efecto sobre hiperglicemia, HbA1c, hiperinsulinemia y concentración de lactato en suero. No mejora impedimentos en aprendizaje espacial y memoria en ratones diabéticos, los ratones no presentan deficiencias en aspectos relacionados con las emociones y memoria. Reduce los niveles de fosforilación de la proteína tau, disminuye la fosforilación de JNK y no afecta la fosforilación de GSK-3 β ni el nivel de proteína de Cdk5 (principales cinasas de tau). No tiene efecto sobre las subunidades de la fosfatasa PP2A, atenúa la reducción de sinaptofisina en hipocampo observada en ratones diabéticos, atenúa los niveles de A β 1-42 (Li <i>et al.</i> , 2012).
	Decrece la viabilidad celular dependiente de dosis y tiempo, incrementa marcadores de apoptosis, a altas dosis incrementa la expresión de la proteína precursora del péptido amiloide y la formación y agregación de fragmentos de A β así como los niveles de mRNA tanto de APP

	como de presinilina. Induce la generación de especies reactivas de oxígeno y disfunción mitocondrial de manera dependiente a la dosis, incrementa la expresión de Nf- κ B un factor de transcripción que regula APP y presinilina (Picone <i>et al.</i> , 2015).
	Incrementa el contenido intra y extracelular de A β de manera dependiente a la dosis, este incremento resulta de la sobrerregulación de la transcripción de la enzima β -secretasa 1 (BACE1) en parte por vías de señalización mediadas por AMPK. El efecto es independiente de la concentración de glucosa y señalización de insulina. La acumulación de insulina en el cerebro de los ratones fue de 1 μ M (Chen <i>et al.</i> 2008).
Diabetes mellitus	Rescata la viabilidad celular, normaliza la actividad de las caspasas 3/9, disminuye la transcripción de los receptores a AGEs, previene la salida del citocromo C desde la mitocondria, potencia la transcripción y traducción de PGC1 α , NRF1, y Tfam, así como de AMPK. Restaura niveles de ATP y promueve la biogénesis y remodelación mitocondrial. Restaura el nivel de la función respiratoria máxima, actividad de citocromo oxidasa y el potencial de membrana mitocondrial. Aumenta la transcripción de genes PPAR, Bcl-2 y CREB (Chung <i>et al.</i> , 2015).
	El tratamiento con metformina reduce la concentración de MDA en el hipocampo y córtex, eleva la concentración de grupos tiol, la metformina ejerce un efecto antioxidante <i>in vivo</i> y mejora el aprendizaje y memoria (Mojtaba <i>et al.</i> , 2015).
	La metformina protege de la peroxidación de lípidos, reduce la formación de MDA, no afecta la oxidación de proteínas ni la producción de H ₂ O ₂ , incrementa los niveles de GSH, reduce la actividad de las enzimas GPx y Gred (Correira <i>et al.</i> , 2008).
	Reduce MDA aproximadamente un 50%, reduce la pérdida de GSH y GSSG, atenúa el defecto en la actividad de GR provocado por DM, así como los cambios en la actividad de CAT, GPx y SOD, disminuye la formación de EROs, AGEs y formación de pentosidina (Clark <i>et al.</i> 2017).
Hipoglucemia ocasionada por diabetes.	En condiciones de hipoglucemia la metformina disminuye la viabilidad celular en SH-SH5Y, incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno, decrece la fosforilación de ERK y GSK3 β de manera dependiente de la dosis, incrementa la expresión de proteínas Bax y Bcl-2 decrece, incrementa la proteólisis de PARP de manera dependiente de la dosis (Lamichhane <i>et al.</i> , 2017).
Fosforilación de la proteína Tau	Reduce la fosforilación de p70S6 cinasa y S6, tiene efecto directo sobre la asociación entre PP2Ac, la subunidad reguladora de PP2A- α 4 y la ubiquitin ligasa MID1. La metformina interfiere directamente con la PP2A inhibiendo su degradación proteosomal, reduce la fosforilación de GSK3 β en la posición ser9 activando a la enzima. En neuronas primarias tiene un efecto agudo y prolongado en la actividad de PP2A que probablemente supere la contra regulación de GSK3 β de la fosforilación de tau y la activación de AMPK sola no es suficiente para imitar la acción de la metformina en la fosforilación de tau
Función cognitiva	La administración de metformina previene las deficiencias provocadas por Cisplatina sobre la función cognitiva específicamente en orientación espacial y memoria, además previene completamente la alodinia mecánica, previene las anomalías en la organización de la materia blanca, arborización neuronal y densidad de las espinas dendríticas (Zhou <i>et al.</i> , 2016).
Neurona corticales primarias	Previene la muerte celular inducida con etopósido en neuronas corticales primarias de rata, retarda o inhibe la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial, inhibe la disipación del potencial de membrana mitocondrial y previene la liberación del citocromo C (El-Mir <i>et al.</i> , 2007).
Encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE)	Atenúa la inducción de EAE por restricción de la infiltración de células inflamatorias dentro del sistema nervioso central reduce la expresión de citosinas proinflamatorias (IFN-gamma, TNF alfa, interleucina 6, interleucina 17 y sintasa de NO inducible), moléculas de adhesión celular, metaloproteínasa 9 y quimoquinas, restaura la actividad de AMPK con la subsecuente inhibición de la síntesis de la biosíntesis de ácidos grasos y colesterol.

**Desorden de estrés
postraumático**

La metformina permite la fosforilación de AMPK en hipocampo después de 1 día de tratamiento, promueve la biogénesis mitocondrial al incrementar la expresión de PGC1 α protege de apoptosis en el hipocampo al reducir la expresión de PARP, incrementa mRNA de Tfam, evita el incremento en la expresión de genes que participan en el estrés oxidante (Wang *et al.*, 2017).

2.4 SINAPSIS

2.4.1 Definición de sinapsis

La sinapsis es el sitio en donde una neurona hace contacto con otra célula nerviosa, glandular o muscular (Guo & Mattson 2000); durante este proceso las células se aproximan sin que exista continuidad entre sus membranas plasmáticas y ocurre la transferencia de información entre la célula que la emite (presináptica) y la que la recibe (postsináptica). Estos contactos se hacen sobre las dendritas, donde normalmente la terminación presináptica es adyacente a la postsináptica (Purves *et al.* 2007).

De acuerdo con el mecanismo de transferencia de información, la sinapsis puede dividirse en eléctricas y químicas; en la primera, las membranas plasmáticas de la neurona pre y postsináptica establecen contacto directo a través de uniones tipo gap permitiendo que los iones fluyan directamente de una célula a otra, favoreciendo la rapidez de este proceso, sin embargo, esta se va perdiendo con el tiempo y la distancia. Por otro lado, en la **sinapsis química** existen neurotransmisores almacenados en vesículas sinápticas que son liberados en la hendidura sináptica, los neurotransmisores se unen a receptores específicos de la membrana postsináptica, ya sea en canales sensibles a ligandos o canales asociados a segundos mensajeros activando cascadas de información (Randall *et al.*, 2002).

Durante la sinapsis los procesos de señalización se encuentran altamente concentrados y participan en la regulación de la supervivencia y en la plasticidad neuronal. El impedimento cognitivo se ha relacionado con la disminución del número promedio de sinapsis en el cerebro (Terry & Katzman, 2000). La disminución en la densidad sináptica se refleja con la pérdida de la mayoría de los componentes de las vesículas sinápticas, así como de los péptidos almacenados en éstas (Arendt, 2001) y constituye un evento previo a la muerte neuronal.

2.4.1.1 Vesículas sinápticas

En la sinapsis química, la terminal presináptica contiene toda la maquinaria molecular necesaria para funcionar como un compartimento subcelular autónomo altamente especializado en el tráfico local y el reciclado de vesículas sinápticas que contienen en su interior el neurotransmisor (Perissinotti, 2010). El citoplasma presináptico contiene gran número de vesículas sinápticas de aproximadamente 50 nanómetros de diámetro (300 000 vesículas por terminal), se han detectado aproximadamente 400 proteínas distintas asociadas a estas vesículas sinápticas, de las que aproximadamente el 10% se consideran residentes en las mismas y solo 6 de ellas (sinaptofisina, sinaptobrevina 2, transportador de glutamato (VGLUT 1 o 2), sinaptotagmina 1, Sinapsina 1 y Rab 3A) representan el 40% del contenido proteico de las vesículas (Nagy, 1976).

2.4.1.2 Sinaptofisina

La **sinaptofisina** (Syp) es una glicoproteína de 38 kD con cuatro dominios transmembranales, es la segunda proteína más abundante de las vesículas presinápticas y a menudo se utiliza como marcador de éstas (Kwon & Chapman, 2011). La sinaptofisina se utiliza también como indicador del incremento en la sinaptogénesis que tiene lugar en la plasticidad neuronal (Rossetti *et al.*, 2012). Esta proteína ha sido asociada con la exocitosis, formación de sinapsis, biogénesis y endocitosis de las vesículas sinápticas. La pérdida de la proteína ha sido asociada con déficits cognitivos, que sugiere un papel importante en la regulación de la transmisión sináptica en circuitos neuronales implicados en el aprendizaje y memoria (Kwon & Chapman, 2011).

2.5 SINAPTOSOMAS COMO MODELO DE ESTUDIO

2.5.1 Sinaptosomas

Los sinaptosomas son terminales nerviosas aisladas, obtenidas por primera vez en 1957. Presentan una membrana plasmática sellada, una o más mitocondrias, vesículas semejantes en número y tamaño a las vesículas sinápticas observadas *in situ* y una zona electrodensa en la membrana similar a la presente en las membranas sinápticas. Estas estructuras se obtienen al someter el tejido cerebral a la homogenización en un medio isosmótico de sacarosa 0.32 M, contienen todos los elementos involucrados en la formación y consolidación de los contactos sinápticos, almacenamiento de neurotransmisores, liberación y regulación de las funciones sinápticas.

Se han reportado cambios bioquímicos relacionados con apoptosis en sinaptosomas corticales cuando estos son expuestos a agentes oxidantes como el Fe^{2+} o $\text{A}\beta$, después de la exposición se ha observado pérdida de la asimetría de los fosfolípidos de membrana, activación de caspasas y alteraciones mitocondriales características de la apoptosis que se pueden revertir al prevenir la activación de ciertas caspasas con inhibidores específicos (Mattson *et al.*, 1998).

Los sinaptosomas han sido utilizados para el estudio de la expresión diferencial de proteínas implicadas en la función sináptica en un modelo murino de DM inducida con estreptozotocina (Cruz-Mendez, 2017), así como en pruebas de estrés oxidante inducido con FeSO_4 , 4-hidroxinonal y $\text{A}\beta$ y el efecto de compuestos como curcumina y DEN-CURC(G-2)OH (Pérez, 2014), agentes antioxidantes como glutatión (Keller *et al.*, 1997) sobre la integridad de los sinaptosomas.

Por lo anteriormente descrito, los sinaptosomas son un modelo idóneo para el estudio de los efectos de la metformina sobre la integridad de las terminales nerviosas bajo condiciones de estrés oxidante.

2.5.2 Estrés oxidante inducido con Cobre.

El cobre (Cu) es un metal esencial en el organismo, es el tercer elemento traza con mayor abundancia en el cuerpo y a concentraciones fisiológicas es requerido para el desarrollo y funcionamiento normal del cerebro. Desempeña un importante papel como cofactor de diversas enzimas envueltas en procesos celulares indispensables como la respiración mitocondrial, la defensa antioxidante y la síntesis de neurotransmisores (Bulcke *et al.*, 2015). El cerebro es el segundo órgano con mayor concentración de Cu, esta concentración oscila entre 2.9-10.7 $\mu\text{g Cu/g}$ de tejido. En concentraciones que exceden el rango fisiológico, este elemento ejerce efectos tóxicos sobre la célula; concentraciones de 7.8-37.8 mg/l de Cu han sido reportados en pacientes con síntomas neurológicos relacionados con la demencia (Nschwartz, 2008). Específicamente, en la demencia tipo Alzheimer se ha reportado que la concentración de este elemento en el SNC se encuentra dos veces más elevada que en sujetos sanos (Hershey *et al.*, 1983; Basun *et al.*, 1991). Diversos estudios epidemiológicos y clínicos han mostrado una fuerte correspondencia entre la exposición a metales y enfermedades neurológicas como la aceruloplasminemia, EA, esclerosis lateral amiotrófica, trastornos autistas, enfermedad de Guillain-Barré, enfermedad de Huntington, esclerosis múltiple, Parkinson y enfermedad de Wilson (Chen, 2016)

La toxicidad de este metal ha sido asociada a su alta actividad redox; para actuar como cofactor, presenta la forma mono (Cu^+) y divalente (Cu^{2+}), la transición entre estos dos estados de oxidación generan EROs rápidamente sometiendo a la célula a estrés oxidante, dañando componentes celulares y conduciendo a la muerte celular (Manzl *et al.*, 2004).

Diversos estudios han demostrado que la exposición de cultivos celulares al cobre induce la muerte. Tanto cultivos neuronales como gliales expuestos a 10-100 μM de Cu presentaron contracción progresiva del cuerpo y posteriormente la muerte (Sheline *et al.*, 2002), este elemento es capaz de inhibir de forma temprana a la enzima piruvato deshidrogenasa neuronal, así como a la α -cetoglutarato deshidrogenasa (Sheline *et al.*, 2004). Ensayos con MTS muestran que la exposición de estos cultivos a concentración de 40 μM o más altas, reduce considerablemente la actividad mitocondrial indicando la reducción en la actividad metabólica o la viabilidad celular, incrementa la producción de EROs, aumenta el estrés oxidativo por la depleción en el nivel de la enzima glutatión y promueve la peroxidación lipídica.

III. JUSTIFICACIÓN

La metformina es el fármaco que se utiliza con mayor frecuencia para el tratamiento tanto de la DMT2 como de la obesidad ya que es el que presenta menos efectos adversos y son múltiples los beneficios que se han asociado a su uso. El estudio de los efectos de la metformina se ha extendido en modelos tanto *in vivo* como *in vitro* cuyos resultados sugieren que la metformina promueve la supervivencia celular al actuar como molécula antioxidante además de contener contra la aparición de enfermedades neurodegenerativas; sin embargo, en otros trabajos se ha encontrado que bajo algunas condiciones actúa como molécula pro oxidante y promueve la aparición y acumulación de $\text{A}\beta$. Debido a estos hallazgos controversiales, en este trabajo se evaluará el efecto de la metformina sobre terminales nerviosas dañadas con un agente oxidante y determinar su actividad como molécula pro oxidante/antioxidante.

IV. HIPÓTESIS

Si la metformina posee capacidad antioxidante atenuará el daño en sinaptosomas causado por estrés oxidante inducido por sulfato de cobre.

V. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el efecto que ejerce la metformina sobre la función sináptica ante daño oxidativo.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la función mitocondrial de sinaptosomas expuestos a la metformina en concentraciones de 1mM o 10mM antes o después de causar daño por estrés oxidativo.
- Evaluar la capacidad antioxidante total de la metformina y de los sinaptosomas expuestas al fármaco.
- Determinar el efecto de la metformina sobre la peroxidación lipídica de las membranas sinaptosomales tratadas con metformina.
- Evidenciar cambios en la cantidad total de la proteína sinaptofisina de los sinaptosomas tratados con metformina antes y después de un daño oxidante.

.VI. MATERIALES Y METÓDOS

6.1 Material biológico

Para llevar a cabo las pruebas experimentales se utilizaron terminales sinápticas (sinaptosomas) obtenidas del cerebro de ratas.

El tejido cerebral se obtuvo de ratas macho (*Rattus norvegicus*) adultos de la cepa Wistar de 250-300 gramos de peso, criadas en el bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suarez", bajo condiciones ambientales controladas (22-24 °C, 45-55% de humedad relativa y ciclos de luz oscuridad 12/12) y alimentadas con una dieta estándar *ad libitum* hasta 12 horas antes del momento del sacrificio. Todos los animales fueron tratados de acuerdo con la NOM-062-ZOO-1999 y el reglamento interno del Comité Interno para el Cuidado de los Animales de Laboratorio (CICUAL) para evitar o disminuir el sufrimiento de los animales ("Estudio del impacto de la diabetes sobre la síntesis

de proteínas sinápticas y su implicación en los mecanismos neurodegenerativos, con número de registro 09/16).

6.1.1 Obtención de la fracción sinaptosomal

Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (50µl/Kg) i. p. y posteriormente decapitadas, inmediatamente después de la decapitación, el cerebro fue extraído y lavado con buffer de fosfatos (NaCl 138mM, KCl 3 mM, Na₂HPO₄ 8.1mM, KH₂PO₄ 1.5mM, pH 7.4), se separaron y desecharon los bulbos olfatorios y el cerebelo, el tejido restante fue homogeneizado al 10% p/v en un medio de homogenización (HEPES 3.7mM , sacarosa 320 mM, pH 7.4) con inhibidor de proteasas 1: 10; para llevar a cabo esta operación se utilizó un homogeneizador tipo Potter-Elvehjem (Wheaton®) de 15 ml con vástago de teflón y eje de acero inoxidable, se realizaron 10 toques ascendentes y descendentes a 1200 rpm, el primer golpe con una duración de 5-6 segundos y los restantes de 3-4 segundos. Todo el procedimiento se realizó a 4°C.

El homogenado obtenido fue centrifugado a 1200 xg durante 10 minutos a 4°C utilizando una centrifuga refrigerada (Z383K Hermle), el pellet (P1) fue descartado y el sobrenadante (S1) fue centrifugado nuevamente a 22 000 xg durante 30 minutos a 4°C en una microcentrifuga refrigerada (Eppendorf®), el sobrenadante (S2) fue desechado y el pellet (P2) resuspendido en 3 ml de buffer de homogenización con inhibidor de proteasas 1:10. Estas muestras fueron almacenadas a -70 °C hasta su uso. Se tomaron 250 µl de cada una de las fracciones S1, P1, S2 y P2 para verificar la presencia de sinaptofisina.

6.2 Reactivos

La metformina utilizada en los experimentos fue adquirida en la presentación comercial de 500 mg, se preparó en una solución stock de 1M en HEPES 50 mM a pH de 7.4 y se mantuvo a 4 °C. El sulfato de cobre (CuSO₄) se preparó en una solución stock de 1M al inicio de cada experimento, a partir de esta solución de hicieron las diluciones correspondientes para obtener la concentración requerida, la solución se mantuvo a 4 °C durante el experimento.

6.3 Diseño experimental

6.3.1 Lavado de sinaptosomas

Para realizar el tratamiento, los sinaptosomas previamente congelados fueron descongelados a temperatura ambiente, posteriormente, la muestra fue centrifugada a 22 000 x g durante 10 minutos a 4°C en la microcentrífuga. A continuación, a la muestra se le realizaron tres lavados, cada uno de ellos consistió en la resuspensión del pellet (P2) en buffer HEPES-Na (50mM, pH 7.4) y posterior centrifugación a 22 000 xg durante 10 minutos a 4°C.

El pellet obtenido en la última centrifugación fue resuspendido en medio de incubación (NaCl 1.4 M, KCl 50 mM, HEPES 200 mM, NaHCO₃ 50 mM, MgCl₂ 10mM, Na₂HPO₄ 12 mM, Glucosa 100 mM, pH 7.4) con inhibidor de proteasas 1:10; el volumen del medio de incubación necesario para la resuspensión de los sinaptosomas fue calculado a partir de la siguiente fórmula: Volumen de resuspensión= (gramos de tejido cerebral X 1000) / 40.

6.3.2 Curva concentración-efecto de sinaptosomas tratados con CuSO₄.

Los sinaptosomas fueron divididos en 7 grupos, cada uno por triplicado y posteriormente preincubados a 37 °C durante 30 minutos en el agitador, transcurrido el lapso, 6 de las muestras fueron tratadas con sulfato de cobre (CuSO₄) a concentraciones de 1, 5, 10, 50, 100 y 150 μM durante 30 minutos a 37°C. La función mitocondrial fue estimada con el ensayo de MTT (apartado 6.4.1), para los tratamientos posteriores se utilizó la concentración que disminuyó la viabilidad celular aproximadamente al 50%.

6.3.3 Tratamiento de sinaptosomas con CuSO₄ y metformina.

Una vez lavados, los sinaptosomas fueron divididos en 8 grupos, cada uno por triplicado, las muestras fueron preincubadas a 37 °C durante 30 minutos en agitación, después de la preincubación cada uno de los grupos fue tratado con metformina 1mM, 10 mM o sulfato de cobre 50 μM como se muestra en la tabla II. y se incubaron a 37°C durante 30 minutos, el tiempo total de incubación fue de 120 minutos para todos los grupos

Tabla III. Tratamiento de sinaptosomas con CuSO₄ y metformina. En la tabla se muestran los tiempos de incubación y concentraciones del sulfato de cobre y metformina a los que fueron sometidas las muestras de los diferentes grupos después de que fueran preincubadas. Control (C), sulfato de cobre 50 μM (CuSO₄), metformina 1mM (m 1mM), metformina 10 mM (m 10mM), sulfato de cobre + metformina 1mM (CuSO₄+ m 1mM), sulfato de cobre + metformina 10 mM (CuSO₄+ m 10mM), metformina 1mM +

sulfato de cobre 50 μ M (m 1mM+CuSO₄), metformina 10 mM + sulfato de cobre 50 μ M (m 10mM+CuSO₄).

Grupo	1ª incubación (0-30 minutos)	2ª incubación (30-120 minutos)
C	-----	-----
CuSO₄	sulfato de cobre 50 μ M	-----
m 1mM	metformina 1 mM	-----
m 10mM	metformina 10 mM	-----
CuSO₄+ m 1mM	CuSO ₄ 50 μ M	metformina 1mM
CuSO₄+ m 10mM	CuSO ₄ 50 μ M	metformina 10 mM
m 1mM+CuSO₄	metformina 1 mM	CuSO ₄ 50 μ M
m 10mM+CuSO₄	metformina 10 mM	CuSO ₄ 50 μ M

6.4 Evaluación del efecto del sulfato de cobre y metformina sobre los sinaptosomas

6.4.1 Función mitocondrial.

La función mitocondrial fue estimada por el ensayo de reducción del Bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) a cristales de formazan. De cada uno de los grupos tratados previamente se tomaron 50 μ l de muestra y se colocaron en una microplaca de 96 pozos (Falcon ®), a cada muestra se le agregaron 5 μ l de solución de MTT preparada a 5mg/ml en PBS. La microplaca fue introducida en la incubadora a 37°C durante 120 minutos; una vez terminada la incubación y con el fin de disolver los cristales formados en la reacción con MTT fueron agregados 55 μ l de dodecil sulfato sódico (SDS) al 10% a cada muestra e incubadas durante 30 minutos, las muestras fueron leídas a 570 nm en el lector multimodal de placas Cytation3 (Biotek ® instruments, Inc.) con el software Gen5™, las absorbancias fueron expresadas como porcentajes con respecto al grupo control.

6.4.2 Capacidad antioxidante total por medio de la prueba de Poder Antioxidante por Reducción del Hierro (FRAP).

Para llevar a cabo esta prueba, las muestras fueron centrifugadas a 22 000 x g durante 10 minutos a 4 °C después de finalizado el tiempo de tratamiento, el sobrenadante fue utilizado para realizar la prueba de capacidad antioxidante extracelular. Al pellet se le realizaron dos lavados (descrito en el apartado 6.2.1), en el segundo lavado, las muestras se separaron

en dos alícuotas, una de 750 μ L y otra de 250 μ L y fueron centrifugadas; para esta prueba se utilizó la alícuota de 250 μ L, al pellet se le agregó 100 μ L del reactivo de FRAP y se realizaron tres ciclos de sonicación de 60 segundos cada uno, entre estos, las muestras se agitaron en el vórtex; posteriormente las muestras se centrifugaron a 22 000 x g durante 10 minutos a 4 °C, el sobrenadante fue utilizado para realizar la prueba de capacidad antioxidante intracelular.

La prueba se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Katalinic *et al.* (2004). En una microplaca de 96 pozos se agregaron (por cada muestra a analizar) 30 μ l de agua calidad HPLC y 200 μ l de solución de trabajo, compuesta por 2,4,6- tripiridil-s-triazina (TPTZ) 10 mM diluido en ácido clorhídrico 40 mM a 50°C, buffer de acetatos (pH 3.6) y cloruro férrico 20 mM en proporción 1:10:1 y se incubaron a 37 °C durante 10 minutos; posteriormente, a la solución contenida en los pozos de la microplaca se agregaron 20 μ l de cada una de las muestras y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos. Se construyó una curva patrón con disoluciones de concentración conocida de FeSO₄ comprendidas entre 0.1 y 1mM. La absorbancia fue medida a 530 nm en el lector multimodal de placas. La capacidad de la muestra de reducir el ion férrico se calculó a partir de la curva de calibración y la capacidad antioxidante se expresó como μ mol/L de Fe (II) por mg de muestra.

6.4.3 Poder reductor de la metformina

La prueba se realizó siguiendo el método descrito por Oyaizu (1986). A una alícuota de 500 μ l de metformina a concentración de 1 y 10 mM se les añadió 1 ml de buffer de fosfatos (NaCl 138mM, KCl 3mM, Na₂HPO₄ 8.1mM, KH₂PO₄ 1.5mM, pH 6.6) y 1 ml de ferrocianuro potásico al 1%, la mezcla se incubó a 50 °C durante 30 minutos en el agitador orbital, posteriormente, a la muestra se le agregó 1 ml de ácido tricloroacético al 10% (p/v) en agua. La muestra fue centrifugada a 1650 x g durante 10 minutos, se tomó 1ml del sobrenadante y se le agregó 1ml de agua destilada y 0.25 ml de cloruro férrico al 0.1 %, las muestras fueron incubadas durante 10 minutos en oscuridad. La absorbancia se midió a 700 nm en un espectrofotómetro, como control positivo se utilizó ácido ascórbico en concentraciones similares a la muestra de metformina.

6.4.4 Precipitación de proteínas

La alícuota de 750 μ L obtenida en el apartado 6.4.2 se utilizó para precipitación de proteínas. Una vez centrifugado, al pellet se le agregaron 100 μ L de buffer RIPA (NaCl 150

mM, tris pH 8.0, Deoxicolato de sodio, SDS 10%, NP-40 10%) e inmediatamente fue agitado en el vórtex hasta su completa resuspensión, posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 22 000 x *g* durante 10 minutos a 4 °C, el pellet fue descartado, al sobrenadante se le agregó 1 mL de acetona y se mantuvo en refrigeración a -20 °C durante 1 hora, posteriormente fue centrifugado a 22 000 x *g* durante 10 minutos a 4 °C, el sobrenadante fue descartado y el pellet se dejó secar al aire libre durante 5 minutos, después se le agregó 1 mL de etanol a 4 °C, se resuspendió el pellet y nuevamente fue centrifugado a 15 7000 x *g* durante 5 minutos a 4 °C, el pellet se secó al aire libre durante 5 minutos, finalmente se agregaron 100 µl de buffer RIPA y se agitaron en el vórtex nuevamente.

6.4.5 Método Slot-Blot para inmunodetección de 4-HNE y sinaptofisina.

A las muestras obtenidas en el apartado 6.4.4. se les añadió 250 µl de PBS, las muestras se mezclaron y después se centrifugaron a 22 000 x *g* durante 3 minutos a 4 °C, posteriormente el sobrenadante fue transferido a una membrana de nitrocelulosa con un aparato de Slot-Dot Blot (Bio-Rad) y una bomba de vacío (Felisa).

La membrana de nitrocelulosa se equilibró durante 5 minutos en TBS (Tris-base 20mM. NaCl 1.37M, pH 7.6) y posteriormente el equipo de Slot-Dot Blot fue montado siguiendo el instructivo del fabricante. Se aplicó vacío en la membrana durante 10 minutos para remover el exceso de TBS, posteriormente, para rehidratar la membrana se colocaron 100 µl de TBS en cada pozo, se aplicó vacío nuevamente hasta remover el exceso de TBS, se apagó el vacío y las muestras fueron añadidas en los pozos del equipo y nuevamente se aplicó vacío durante 45 minutos o hasta que la muestra fuese removida, las paredes de cada pozo fueron enjuagadas con 200 µl de TBS y éste fue filtrado nuevamente.

La membrana fue removida del aparato de Slot-Dot Blot y se procedió a realizar la tinción con rojo de Ponceau durante 30 minutos, posteriormente se realizaron tres lavados con TBS-T (Tris-HCl 20 mM, NaCl 137 mM, Tween 20 0.05%, pH 7.6) de 5 minutos cada uno para remover el exceso de colorante. La membrana se incubó con anticuerpo primario 1:1000 en TBS-T leche 3% durante una hora a temperatura ambiente, transcurrido el lapso, la membrana fue lavada 2 veces con TBS-T durante 5 minutos, una vez realizados los lavados, la membrana fue a incubada con el anticuerpo secundario en TBS-T leche 3% durante 60 minutos a temperatura ambiente seguida de 2 lavados con TBS-T de 5 minutos

cada uno. Finalmente, la detección fue realizada con el reactivo Clarity™ Western ECL substrate (Bio-Rad).

Tabla IV. Anticuerpos utilizados para la detección de 4-HNE y sinaptofisina.

Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo secundario	Dilución
4-HNE	1:1000	α-mouse	1:2000
Sinaptofisina	1:1000	α-rabbit	1:2000
GADPH	1:1000	α-rabbit	1:2000

6.5 Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como media ± SEM. Los datos obtenidos fueron analizados con el programa estadístico *GraphPad Prims 5*. Para determinar las diferencias entre grupos se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. Se consideró una diferencia significativa a una $p < 0.05$.

El procesamiento de las imágenes obtenidas de las inmunodetecciones de 4-HNE y sinaptofosina se analizaron con el programa image J y posteriormente con el programa estadístico *GraphPad Prims 5*.

VII. RESULTADOS

7.1 Curva concentración-efecto de CuSO₄ sobre la función mitocondrial de sinaptosomas.

Con la finalidad de encontrar la concentración a la que el CuSO₄ induce el 50% de pérdida de la función mitocondrial en los sinaptosomas, éstos fueron incubados durante 30 minutos a distintas concentraciones de CuSO₄ y posteriormente analizados con el ensayo de MTT. En la figura 6 se observa que la reducción del MTT decrece conforme aumenta la concentración de CuSO₄, se tomó como referencia al grupo control que representa el 100%, a concentración de 1 µM de CuSO₄, la actividad enzimática decrece al 82.9 %, a 5 µM se encuentra al 73%, en 10 µM la reducción del MTT se encuentra al 61.8%, mientras que a 50 µM ésta se encuentra al 41 %, a 100 y 150 µM el porcentaje de MTT reducido fue de 32.4 y 23.2% respectivamente. De acuerdo con la prueba estadística de Bonferroni, todos los grupos fueron significativamente diferentes con respecto al grupo control y con

excepción de las concentraciones 50 y 100 μM que no difieren entre sí, hay diferencias entre los grupos.

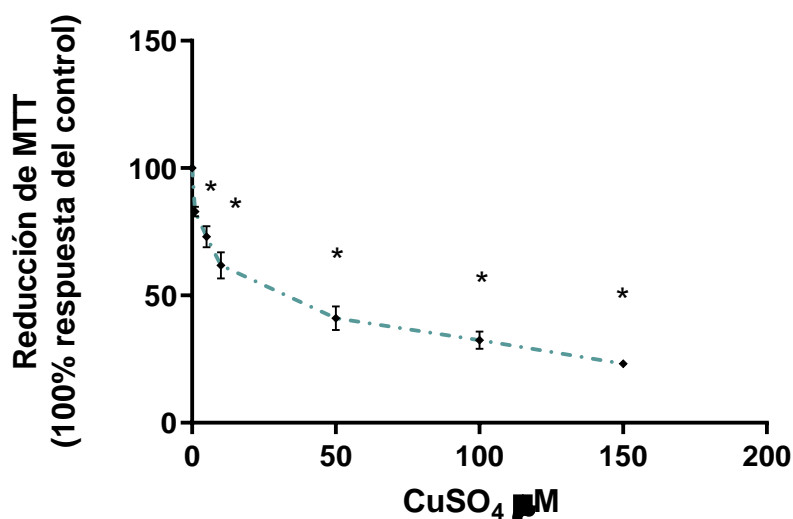


Figura 6. Curva concentración-efecto del CuSO_4 sobre la función mitocondrial de sinaptosomas de rata. Cada punto en la gráfica representa la media \pm SEM de los valores obtenidos en 2 ensayos independientes cada uno realizado por triplicado ($n=2$). * $p<0.05$ vs control. Se realizó una prueba ANOVA seguida de una prueba de Bonferroni.

Por lo tanto, a partir de estos resultados, la concentración utilizada para inducir estrés oxidante a los sinaptosomas fue de 50 μM de CuSO_4 , que induce la pérdida de aproximadamente 58% de la función mitocondrial en los sinaptosomas.

7.2 Efecto de la metformina sobre la función mitocondrial de sinaptosomas bajo estrés oxidante.

En los ensayos realizados con los sinaptosomas en donde la metformina, a concentración de 1 y 10 Mm, fue utilizada como pretratamiento durante 30 minutos antes de la inducción de estrés oxidante o se añadió a la reacción después de 30 minutos de inducido el estrés se evaluó la actividad mitocondrial de la misma forma que en el apartado anterior mediante el ensayo de reducción de MTT. El grupo control (sin tratamiento alguno) se tomó como referencia y representa el estado óptimo de la función mitocondrial (100%). En la figura 7 se observa que la toxicidad del CuSO_4 a 50 μM reduce a un 48.87% la función mitocondrial de los sinaptosomas, con una diferencia mínima en lo determinado en la curva de concentración-efecto (Figura 6); se observa que la metformina en concentración de 1 y 10

mM no tiene efecto sobre la función mitocondrial (96.46 y 109.1% con respecto al control). Así mismo se observó que los grupos tratados con metformina 1 mM pre y post daño oxidante no presentan diferencias en su función con respecto a los tratados únicamente con CuSO_4 (48.51 y 53.59%), por lo que la metformina parece no tener efecto protector a esta concentración. Sin embargo, en concentración de 10 mM, la metformina reduce la disfunción mitocondrial causada por el sulfato de cobre, pues se encontró que después de la inducción de estrés oxidante, la reducción del MTT se encuentra en un 62.9%, mientras que su efecto al ser añadida antes del CuSO_4 se refleja en un 67.1%, teniendo un aumento de alrededor del 16 % en promedio con respecto al tratamiento con CuSO_4 50 μM , estas diferencias son significativas.

Con estos resultados se muestra que la metformina no afecta la actividad enzimática de los complejos respiratorios en condiciones basales, únicamente en la concentración de 10 mM atenúa el daño oxidante provocado por el CuSO_4 además de ser capaz de recuperar la actividad mitocondrial aún después de haber inducido el daño oxidante.

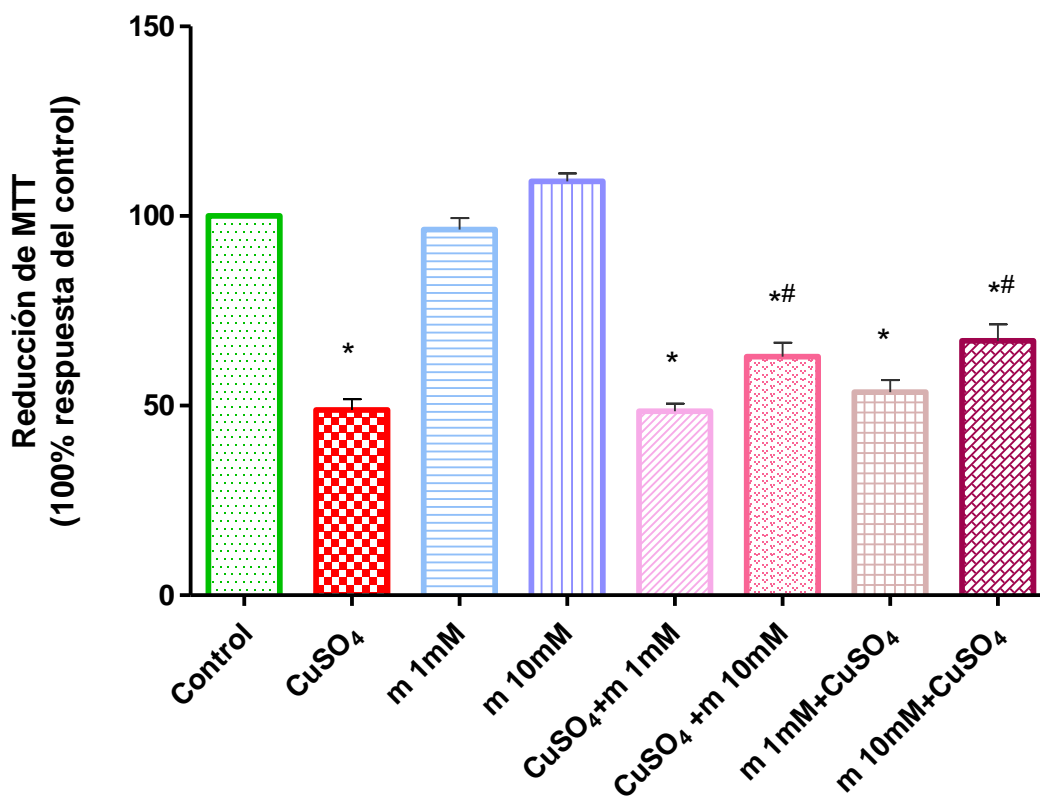


Figura 7. Efecto de la metformina sobre la función mitocondrial de sinaptosomas de rata. Cada columna de la gráfica representa la media \pm SEM de valores obtenidos en 8 ensayos independientes realizados por

triplicado (n=8). *p<0.05 vs control, #p<0.05 vs CuSO₄. Se realizó una prueba ANOVA seguida de una prueba de Bonferroni. m 1 mM: metformina 1 mM, m 10 mM: metformina 10 mM.

7.3 Poder antioxidante de sinaptosomas pre- y postratados con metformina ante daño con CuSO₄.

Con el objetivo de evaluar el efecto antioxidante de la metformina sobre los sinaptosomas, estos fueron sometidos a la prueba de FRAP. Éste ensayo está basado en la rápida reducción de tripiridiltriazina férrica (Fe(III)-TPTZ) por antioxidantes presentes en las muestras y da lugar a la formación de tripiridiltriazina ferrosa (Fe(II)-TPTZ). En la figura 8 se muestran los resultados de este ensayo. Se observa que los valores obtenidos para la capacidad antioxidante del medio extracelular del grupo CuSO₄ (0,028 μMol de Fe(II)/ mg de muestra) se encuentra más elevada que en condiciones control (0.015 μMol de Fe(II)/ mg de muestra), los grupos tratados con metformina a 1 y 10 Mm presentan condiciones similares que el grupo control (0.017 μMol de Fe(II)/ mg de muestra para ambos grupos), mientras que los tratados con 1 mM de metformina antes y después del estrés oxidante son similares al grupo CuSO₄ (0.027 y 0.026 μMol de Fe(II)/ mg de muestra), mientras que los grupos tratados con metformina 10 Mm la capacidad antioxidante se encuentra en 0.032 μMol de Fe(II)/ mg de muestra tanto para el grupo pre como post daño oxidante. Sin embargo, estas diferencias no son significativas.

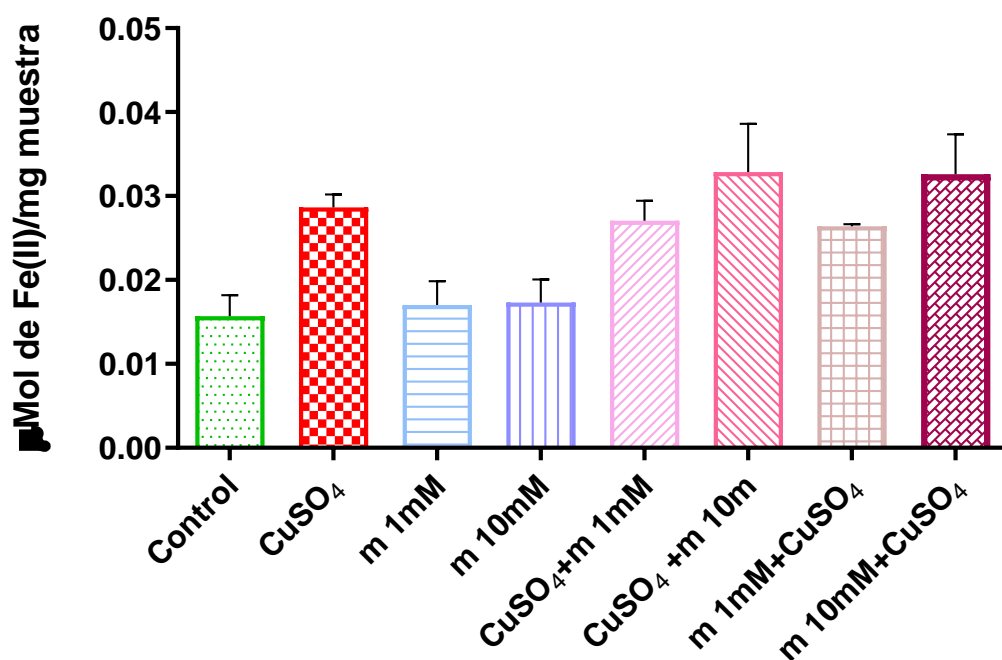


Figura 8. Capacidad antioxidante extracelular de sinaptosomas de rata tratados con metformina. Cada barra representa la media \pm SEM de 3 ensayos independientes realizados cada uno por triplicado (n=3). Se realizó una prueba ANOVA seguida de una prueba de Bonferroni.

7.4 Poder reductor de la metformina

Para comprobar los resultados obtenidos en la prueba de FRAP se realizó la prueba de poder reductor de la metformina. En la figura 9 se presentan los valores obtenidos de la capacidad reductora de la metformina comparada con el ácido ascórbico, que fue utilizado como referencia en las mismas concentraciones de la metformina. La capacidad de la metformina a 1 mM de reducir al hierro se encuentra en 0.059 unidades de absorbancia (UA) y en 0.0573 UA a 10 mM leídas a 700 nm, sin presentar diferencias significativas entre el grupo control. Comparando estos valores con los obtenidos con el ácido ascórbico, cuyos valores fueron de 1.168 y 2.98 para 1 y 10 mM respectivamente, con diferencias significativas respecto al control (0.06), se comprueba que la metformina carece de actividad reductora.

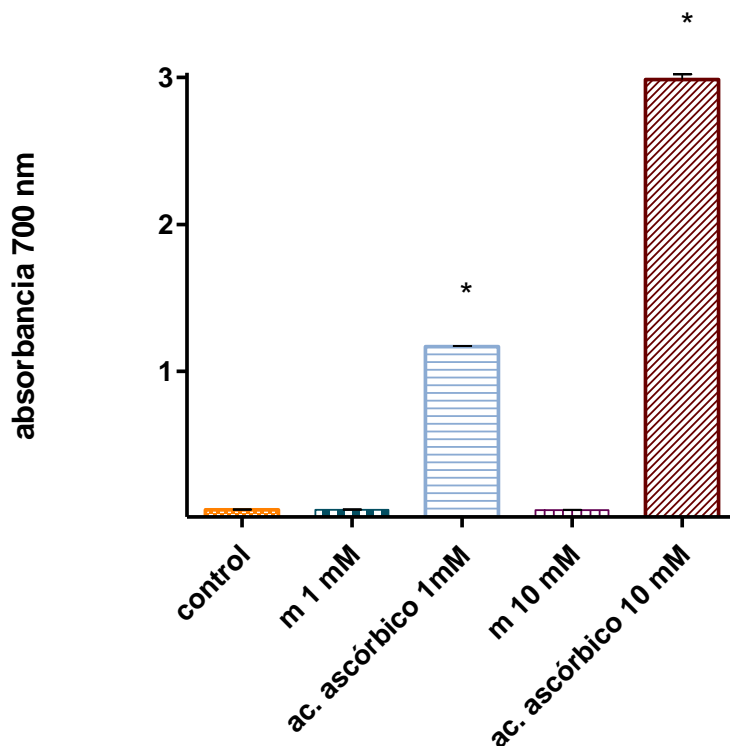
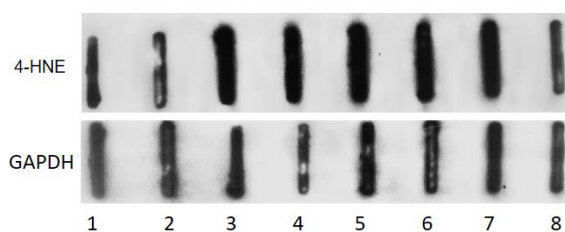


Figura 9. Comparación del poder reductor de la metformina contra el ácido ascórbico. Cada barra representa la media \pm SEM de 3 experimentos independientes (n=3). Se realizó una prueba ANOVA seguida de una prueba de Bonferroni *p<0.05.

7.5.1 Detección de 4-HNE como marcador de peroxidación de lípidos.

El 4-HNE fue utilizado como marcador de peroxidación lipídica de las membranas celulares, ya que es considerado uno de los compuestos con mayor toxicidad producidos durante la lipoperoxidación. Se empleó la detección de GAPDH, como control de carga, para poder realizar la normalización de 4HNE y detectar de esta manera los cambios en los niveles de proteínas modificadas por 4HNE. En las figuras 10 y 11 se observa que la peroxidación de los sinaptosomas del grupo tratado con CuSO_4 es 20% menor con respecto al control, mientras que la metformina en concentración de 1 mM disminuye la concentración de 4HNE en 6%, sin embargo, a 10 mM se incrementa el 13% sobre el control. Cuando los sinaptosomas se trataron previamente con CuSO_4 y posteriormente se trataron con metformina los niveles de proteínas modificadas con 4-HNE se no se incrementaron en el caso del tratamiento con 1 mM o se incrementa en 19% con una concentración de 10 mM. En los grupos que se trataron con metformina antes del daño oxidante los valores fueron de -8% y -28% para las concentraciones de 1 y 10 mM respectivamente.

A)



B)

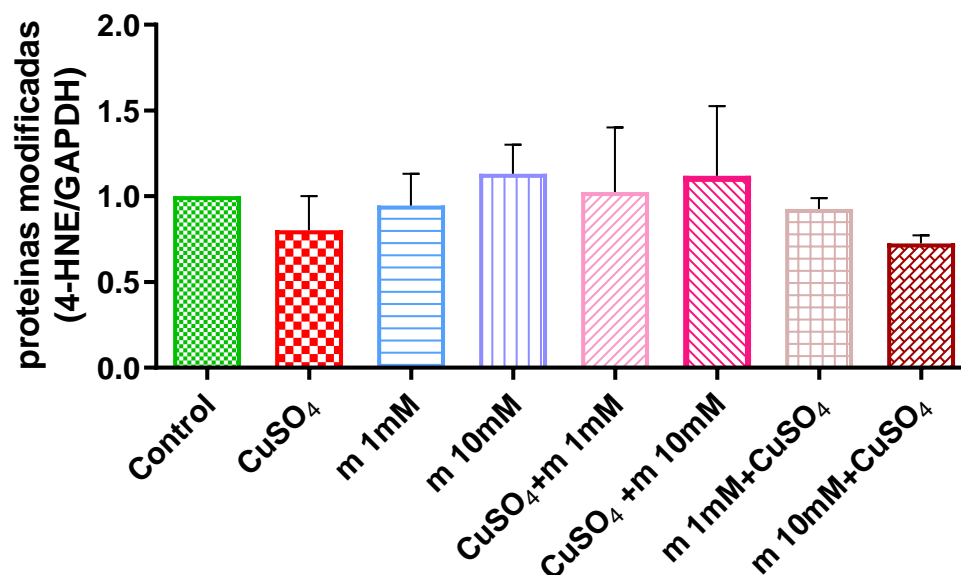
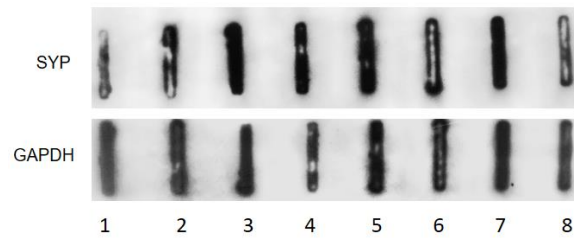


Figura 10. Inmunodetección de 4-HNE en sinaptosomas de cerebro de rata tratados con metformina. A) La imagen es representativa de 2 experimentos independientes. 1: control, 2: CuSO₄, 3: metformina 1 mM, 4: metformina 10 mM, 5:CuSO₄+metformina 1 mM, 6: CuSO₄+metformina 1 mM, 7: metformina 1 mM + CuSO₄, 8:metformina 10 mM+ CuSO₄. B) Porcentajes de lipoperoxidación en sinaptosomas de rata tratados con metformina. Las barras en la gráfica representan la media \pm SEM de 2 experimentos independientes. Se realizó una ANOVA seguida de una prueba de Bonferroni.

7.5.2 Detección de la proteína sinaptofisina como marcador de la integridad de las vesículas sinápticas.

En la figura 11 se observa que con respecto al control (100%) los niveles de sinaptofisina (SYP) disminuyen cuando los sinaptosomas son expuestos a CuSO₄ (-33%), tratados únicamente con metformina a 1 mM la SYP disminuye un 8% mientras que con 10 mM aumenta un 9% con respecto al grupo control. La exposición previa de los sinaptosomas con el CuSO₄ y posterior tratamiento con metformina a 1 y 10 mM hace disminuir la SYP el 36% y el 43% respectivamente, mientras que el pretratamiento con metformina en concentración de 1 mM los niveles de SYP disminuyen solo el 21% y con 10 mM 25% con respecto al grupo control, mostrando que ambas concentraciones pueden incrementar los niveles con respecto al tratamiento con CuSO₄ solo, aunque las diferencias no son significativas.

A)



B)

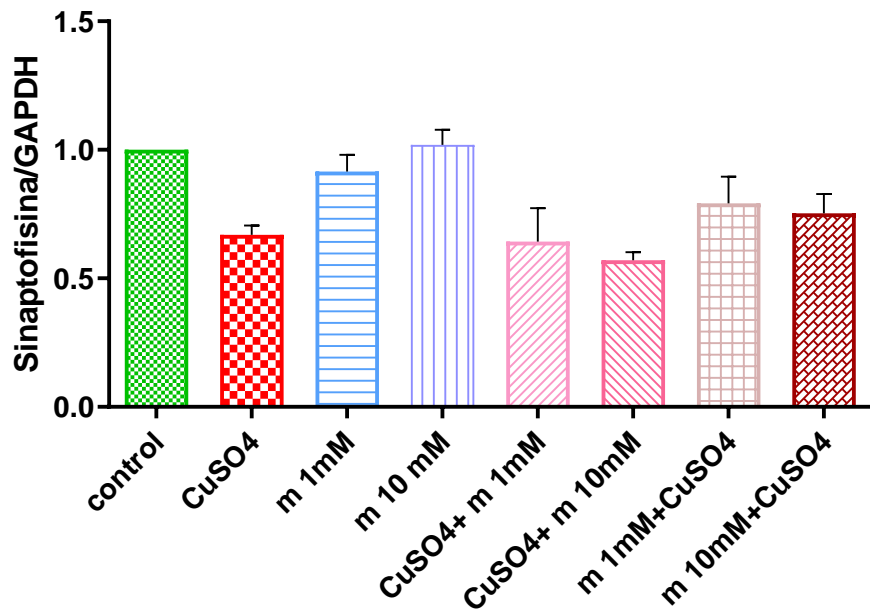


Figura 11. Inmunodetección de sinaptofisina en los sinaptosomas de rata tratados con metformina. A) La imagen es representativa de 2 experimentos independientes. 1: control, 2: CuSO₄, 3: metformina 1 mM, 4: metformina 10 mM, 5: CuSO₄+metformina 1 mM, 6: CuSO₄+metformina 1 mM, 7: metformina 1 mM + CuSO₄, 8: metformina 10 mM + CuSO₄. B) Cuantificación de los niveles de sinaptofisina en sinaptosomas de rata tratados con metformina. Cada barra representa la media ± SEM de dos experimentos independientes (n=2). Se realizó una ANOVA seguida de una prueba de Bonferroni.

En conjunto, estos resultados se resumen en la tabla V.

Tabla V. Valores obtenidos en las distintas pruebas realizadas en los sinaptosomas de rata tratados con CuSO₄ y metformina.

	MTT	SEM	FRAP	SEM	4-HNE	SEM	SYP	SEM
Control	100	0	0.0157	0.0043	1	0	1	0
CuSO₄	48.87	7.97	0.0286	0.0026	0.802	0.28	0.669	0.055
m 1 mM	96.46	8.51	0.0170	0.0048	0.945	0.26	0.915	0.09
m 10 mM	109.15	5.81	0.0173	0.0047	1.130	0.24	1.019	0.08
CuSO₄+m 1mM	48.51	5.7	0.0270	0.0041	1.024	0.53	0.642	0.18
CuSO₄+m10mM	62.90	10.35	0.0328	0.0099	1.119	0.57	0.570	0.04
m 1mM+ CuSO₄	53.59	8.91	0.0263	0.00043	0.926	0.08	0.792	0.15
m10mM+CuSO₄	67.11	12.27	0.0325	0.0082	0.724	0.06	0.753	0.1

VIII. DISCUSIÓN

El estrés oxidante es uno de los factores implicados en una gran variedad de desórdenes neurológicos y se ha determinado como uno de los principales causantes del daño al tejido cerebral durante el desarrollo de DMT2. El cerebro de ratas con DM tiene un mayor contenido de MDA, EROs y NO•, además presentan reducción en la defensa antioxidante, alteraciones en la función mitocondrial, potencial de membrana y producción de ATP (Acar *et al*, 2012; Cardoso *et al*. 2013; Kumar & Menon 1993; Ortiz-Ávila *et al*. 2015); sinaptosomas obtenidos del cerebro de ratas diabéticas presentan disfunción mitocondrial y aumento en la peroxidación de lípidos en porcentajes similares a los obtenidos al tratar sinaptosomas de ratas sanas con FeSO₄ (Cruz-Méndez, 2017).

El CuSO₄ es un compuesto que se ha reportado con un alto potencial redox, sin embargo, no se conocía su efecto como agente oxidante sobre terminales nerviosas, estudios anteriores sugieren que la citotoxicidad del metal puede ocurrir como resultado de la formación de EROs en la mitocondria independientemente de la formación de EROs en el citosol (Pourahmad , 2000), nuestros resultados muestran que la actividad enzimática de los complejos mitocondriales se ven afectadas con el CuSO₄ y el efecto incrementa conforme la concentración de CuSO₄, probablemente por la producción de EROs. Pourahmad & O'Brien (2000) encontraron que en la concentración de 50 µM, el cobre induce el 50% de lisis celular después de dos horas; en nuestro trabajo, aunque no fue

posible valorar muerte celular, se encontró que a esta concentración la cadena respiratoria se encuentra comprometida en un 50% aproximadamente a los 30 minutos de exposición, se tienen reportes de que el cobre induce la formación de radicales libres rápidamente (Valco *et al.* 2005) por lo que su efecto sobre la mitocondria puede verse en tiempos cortos.

Se han realizado múltiples estudios de los efectos de la metformina sobre células no neurales, la concentración de metformina encontrada en plasma usualmente es de $<50 \mu\text{M}$ (Martín-Castillo *et al.* 2010), sin embargo, en los ensayos *in vitro* que muestran efectos benéficos del fármaco sobre las células utilizan concentraciones mayores a esta, $100 \mu\text{M}$, 1 y 10 mM son las concentraciones que se utilizan con mayor frecuencia en estos ensayos (Fang *et al.* 2010); efectos anticancerígenos se han encontrado en concentraciones de 5 - 10 mM (Martín-Castillo *et al.*, 2010). Se ha encontrado que, en fibroblastos humanos, la metformina a 10 mM compromete la integridad celular y estas entran en apoptosis, a 1 mM parece no tener efecto, mientras que en la concentración de $100 \mu\text{M}$ estimula la proliferación celular (Fang *et al.*, 2010). Picone *et al.* (2015) muestran que en células mononucleares de sangre periférica tratadas con metformina durante 24 horas en concentraciones superiores a 10 mM , el fármaco es capaz de reducir la función mitocondrial a un 60% aproximadamente, mientras que en concentraciones inferiores no se observa efecto alguno. El tratamiento de neuronas corticales primarias expuestas a etopósido con metformina en concentraciones de 1 - 10 mM durante 24 horas previene la muerte celular (El-Mir *et al.*, 2008), sin embargo, también se ha reportado que a estas concentraciones $100\mu\text{M}$ - 10 mM , en neuronas corticales primarias y células de neuroblastoma la metformina incrementa la producción y acumulación de $A\beta$ (Chen *et al.* 2008). En nuestros resultados, la actividad enzimática mitocondrial, reflejada en la reducción del MTT de los sinaptosomas en condiciones basales no se ve afectada a 1 mM y a 10 mM se observa un incremento en la reducción de MTT, aunque este cambio no es significativo; cuando los sinaptosomas son tratados con CuSO_4 , la metformina a 1 mM aplicada antes o después de CuSO_4 no tiene efecto alguno, por el contrario, cuando se utiliza la concentración de 10 mM se observa un incremento en la función mitocondrial en ambas condiciones; en este trabajo no fue posible medir marcadores de apoptosis ni proliferación celular debido a las limitantes del modelo, sin embargo con los resultados mostrados, es claro que la metformina actúa a altas concentraciones atenuando los efectos del estrés oxidante sobre la mitocondria y el efecto es mayor cuando se utiliza como pretratamiento.

Los efectos benéficos de la metformina se han asociado a su capacidad antioxidante, sin embargo, las propiedades antioxidantes de la metformina no han sido completamente caracterizadas, Pavlovic *et al* (2000), Chakraborty *et al.* (2011) y Esteghmati *et al.* (2013) han reportado que la metformina tiene la habilidad de neutralizar a las ROS directamente, mientras que Martin-Montalvo *et al.* (2013) encontraron que la metformina incrementa la expresión de varios genes mitocondriales de los complejos I, II y III que pueden reducir la producción de ROS, además Nrf2 es activado y actúa como regulador de la defensa antioxidante mediante la translocación nuclear y activación de elementos de la respuesta antioxidante regulando de este modo la homeostasis antioxidante. Son varios autores los que han reportado que la metformina actúa promoviendo la transcripción de genes de las enzimas involucradas en la defensa antioxidante como son SOD, GSH y Cat (Alsharidah *et al.*, 2018; Khallaghi *et al.* 2016; Chukwunonso *et al.* 2016; Diniz Vilela *et al.*, 2016) previniendo la pérdida y cambios en la actividad de estas enzimas (Clark, 2017). Por otro lado, entre los hallazgos de Picone *et al.* (2015) se encuentra que este fármaco actúa induciendo la producción de ROS tanto en células de neuroblastoma como en células mononucleares de sangre periférica. La prueba de FRAP permite cuantificar a las especies antioxidantes que se encuentran en el medio, se tienen reportes de que las EROs estimulan a enzimas como la GPx y GSR por lo que los valores encontrados para esta prueba son más altos bajo condiciones de estrés oxidante (Diniz Vilela *et al.* 2016). Los sinaptosomas son vesículas que carecen de núcleo por lo que la metformina no puede desencadenar una respuesta transcripcional sobre las enzimas de defensa antioxidante y aunque los resultados que obtuvimos en nuestros ensayos muestran que la actividad de enzimas antioxidantes es mayor en todos los grupos que fueron tratados con CuSO₄ estas diferencias no llegan a ser significativas, esto probablemente a que, como se mencionó anteriormente, no hay una regulación sobre la expresión génica de las enzimas. La prueba de poder reductor de hierro muestra la capacidad de una molécula de reducir el Fe (II), los resultados obtenidos muestran que la metformina carece de poder reductor y al menos bajo condiciones de estrés oxidante inducido con CuSO₄, la metformina no estabiliza a las EROs directamente; por otro lado, se ha reportado que uno de los mecanismos de la metformina para disminuir el estrés oxidante es la disminución de la producción de EROs en la mitocondria, esto se logra por la inhibición parcial del complejo I de la cadena respiratoria (Matsuzaky & Humphries 2015); el complejo I de la mitocondria cataliza la oxidación de NADH y es en donde se genera el anion O₂⁻ (Murphy, 2009), se ha reportado que se requiere de al menos una concentración de 5 mM o 10 mM y una incubación de al menos

2 horas para que se observe un efecto sobre los sustratos dependientes de NADH (Owen *et al.* 2000), Palenickova *et al.* (2011) mostraron que la metformina inhibe la oxidación de sustratos dependientes de NADH después de 3-5 minutos de incubación en concentraciones de 2.5-5 mM en homogenados de hígado de rata; nuestros resultados sugieren que podría ser este el mecanismo por el que actúa la metformina en los sinaptosomas, ya que la disminución de la disfunción mitocondrial solo se observa a la concentración de 10 mM, además, Logie *et al.* (2012) encontraron que la metformina tiene fuerte afinidad por el cobre e incluso “secuestra” a este elemento cuando se encuentra en la mitocondria y que es este complejo el que inhibe a la mitocondria.

Durante el estrés oxidante, uno de los blancos de daño oxidante provocado por las EROs son las colas hidrofóbicas de los lípidos de membrana. El 4-HNE es un producto bioactivo de peroxidación de lípidos que promueve la disfunción de las estructuras celulares vía formación de 4-hidroxi-alquenos estables con proteínas, fosfolípidos y DNA (Vazdar *et al.* 2012) constituye uno de los marcadores más importantes de estrés oxidante ya que afecta la fluidez de la membrana y debido a su capacidad de modificar proteínas, altera la actividad de estas (Chukwunonso *et al.*, 2016). Se ha observado que ratas con DM presentan un aumento en la producción de 4-HNE, tanto como sinaptosomas tratados con FeSO_4 50 μM (Cruz-Méndez, 2017). Los resultados mostrados en las Figuras 10a y b parecen indicar que cualquiera de los tratamientos induce la modificación de proteínas por 4-HNE y no existen diferencias significativas entre el grupo control y los tratados con CuSO_4 y metformina, nosotros creemos que estos resultados se pueden deber a una cuestión técnica, ya que es posible que ocurra una saturación del espacio en donde se depositan las proteínas en el aparato de Dot-Blot, con un exceso de proteínas lo que impide que se puedan cuantificar las diferencias de manera óptima, por lo que se requiere de la cuantificación de proteínas previa a la colocación de las muestras para obtener resultados precisos de esta prueba, dada la importancia de este marcador para la determinación de daño por estrés oxidante, y en dado caso, identificar la formación de otros productos de peroxidación lipídica como el malonaldehído o carboxilación de proteínas para descartar cualquier tipo de error en la metodología.

Los sinaptosomas se caracterizan por conservar gran cantidad de vesículas sinápticas, que contienen a los neurotransmisores utilizados durante la sinapsis, la conservación íntegra de estas vesículas sinápticas permitirá llevar este proceso de manera óptima. La sinaptofisina es una proteína que forma parte de estas vesículas y se considera un marcador de la

plasticidad neuronal, la pérdida de esta proteína está asociada con déficits cognitivos y constituye uno de los elementos más importantes a evaluar en este trabajo. Las figuras 11a y b muestran que la metformina a 10 mM aplicada antes del estrés oxidante tiene la capacidad de preservar a las vesículas sinápticas, lo que implica que hay un mejor proceso de sinapsis que los sinaptosomas con daño oxidante. Sin embargo, cuando se aplica después del daño oxidante inducido por CuSO_4 , no es capaz de preservar los niveles de esta proteína, esto implica un daño irreversible en la integridad de las vesículas sinápticas, sin embargo, aunque se observa esta tendencia, las diferencias no son significativas con respecto al grupo control. Se han encontrado cuatro isoformas de la sinaptofisina: 1 y 3 dependientes de Calcio y 2 y 4 dependientes de voltaje, estas isoformas se encuentran abundantemente en las vesículas sinápticas (Bustillo, 2009) que dificulta la detección de cambios en la expresión de la proteína en un sistema aislado como lo son los sinaptosomas

IX. CONCLUSIONES

1. En condiciones basales la metformina no afecta la función mitocondrial de los sinaptosomas después de 2 horas de exposición.
2. La metformina en concentración de 10 mM atenúa la disfunción mitocondrial provocada por CuSO_4 .
3. La metformina no tiene capacidad reductora.
4. La metformina disminuye la pérdida de la proteína sinaptofisina.

X. PERSPECTIVAS

De acuerdo con los resultados obtenidos, se espera caracterizar la respuesta de los sinaptosomas expuestos a estrés oxidante provocado por agentes distintos al CuSO_4 , y el efecto de la metformina sobre estos. Sería interesante evaluar los parámetros presentados en este trabajo en un modelo de DM con la administración crónica de metformina en distintas concentraciones, así como el efecto de este fármaco sobre la expresión de las principales enzimas de respuesta antioxidante.

XI. REFERENCIAS

1. **Abdelsaid M, Prakash R, Li W, Coucha M, Hafez s, Johnson M, Fagan S & Ergul A.** 2015. Metformin treatments in the period after stroke prevents nitrosative stress and restores angiogenic signaling in the brain in diabetes. *Diabetes*.64: 1804-1817.

2. **Acar A, Akil E, Alp H, Evliyoglu O et al.** 2012. Oxidative damage is ameliorated by curcumin treatment in brain and sciatic nerve of diabetic rats. *Int J Neurisci* 122:367-372.
3. **Adedeji H, Ishola I & Adeyemi O.** 2013. Novel action of metformin in the prevention of haloperidol-induced catalepsy mice: potential in the treatment of Parkinson disease? *Progress in Neuro-Psychopharmacology & biological psychiatry*.48:245-251.
4. **Ahmed N.** 2005. Advanced glycation end products role in pathology of diabetic complications. *Res. Clin. Pract.* 67:3-21.
5. **Almaguer G, Almaguer L.** 2006. Estrés oxidativo y muerte neuronal. Una visión biomolecular. *Rev Mex Neuroci.* 74: 330-337.
6. **American Diabetes Association.**2010. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*.33:62-69.
7. **Arnol, V.** 2012. Efectos de los productos de glicación avanzada (AGEs) y la metformina sobre el hueso; estudios in vitro e in vivo. Tesis para obtener grado de Doctor. Facultad de ciencias exactas. Universidad Nacional la Plata.
8. **Arvanitakis Z, Wilson R, Bienias J, Evans D & Bennet D.** 2004. Diabetes mellitus and risk of Alzheimer disease and decline in cognitive function, *Arch. Neurol.*61:661-666.
9. **Asadbegi M, Yaghmaei P. Salehi I, Ebrahim-Habibi A, Komaki A.** 2016. Neuroprotective effects of metformin against A β -mediated inhibition of long-term potentiation in rats fed a high-fat diet. *Brain research Bulletin*.121: 178-185.
10. **Bailey C & Day C.** 2004. Metformin: its botanical background. *Pract. Diabetes.* 21:115-117.
11. **Biessels A, Kappelle B, Bravenboer D, Erlelens & Gispen W.** 1994. Cerebral function in diabetes mellitus. *Diabetologia.* 37 (7) :643-650.
12. **Biessels G, Kamal A, urban A, Spruijt B, Erkelens D, Gispen W.** 1998. Water maze learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin treatment. *Brain Research.* 800 (1) :125-135.
13. **Blazquez C, Woods A, de Ceballos ML, Carling D, Guzman M.** 1999. The AMP-activated protein kinase is involved in the regulation of ketone body production by astrocytes. *J Neurochem.*73: 1674–1682.
14. **Brands M, Bell T & Gibson B.** 2004. Nitric oxide may prevent hypertension early in diabetes by counteracting renal actions of superoxide. *Hypertension.* 43 (1): 57-63.

15. **Bridges H, Jones A, Pollak M, Hirst J.** 2014. Effects of metformina and other biguanides on oxidative phosphorylation in mitochondria. *Biochem.* 462: 475-487.
16. **Bustillo D, Gutierrez Y, & Rodriguez A.** 2009. La maquinaria molecular de la exocitosis:¿un nuevo marcador en las enfermedades neurodegenerativas?. <https://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/908/876>
17. **Butterfield F, Domenico D, Barone E.** 2014. Elevated risk of type 2 diabetes for development of alzheimer disease. A key role for oxidative stress in brain. *Biochim. Biophys. Acta* 1842: 1693-1706.
18. **Calderón V, Salinas E y Quintanar M.** 2013. Estrés oxidativo y diabetes mellitus. *REB* . 32 (2). pp 53-66.
19. **Cardoso S, Santos R & Correia S.** 2013. Insulin-induced recurrent hypoglycemia exacerbates diabetic brain mitochondrial dysfunction and oxidative imbalance. *Neurobiology of Disease.* 49 (1): 1-1.
20. **Chalhoub N y Baker J.** 2009. PTEN and the PI2-kinase pathway in cancer. *Annual review of pathology.* 4:127-150.
21. **Chen Y, Zhou K, Wang R, Liu Y, et al.** 2008. Antidiabetic drug metformin (Glucophage[®]) increases biogenesis of Alzheimer's amyloid peptides via up-regulating BACE1 transcription. *PNAS.* 105 (10): 2907-2912.
22. **Chung M, Chen Y, Pei D, Cheng Y, Sun B, Nicol C, Yen C, Chen H, Liang Y & Chiang M.** 2015. The neuroprotective role of metformin in advanced glycation end product treated human neural stem cells is AMPK-dependent. *Biochimica et Biophysica acta.* 1852:720-731.
23. **Chukwunonso O, Chinwuba T, Okpashi V, Nonye I & Olisah A.** 2016. Comparative Study of the Antioxidant Effects of Metformin, Glibenclamide, and Repaglinide in Alloxan-Induced Diabetic Rats. *J Diabetes Res.*
24. **Clark G, Pandya K & Lau-Cam C.** 2017. The Effect of Metformin and Taurine, Alone and in Combination, on the Oxidative Stress Caused by Diabetes in the Rat Brain. *Adv Exp Med Biol.*975: 352-369.
25. **Correia S, Carvalho C, Santos M, Proenca T, Nunes E, Duarte A, Monteiro P, Seica R, Oliveira C & Moreira P.** 2008. Metformin protects the brain against the oxidative imbalance promoted by type 2 diabetes. *Medicinal Chemistry.* 4:358-364.
26. **Cruz-Mendez C.** 2017. Evaluación in vitro y ex vivo del efecto neuroprotector y neurogenerador de un nuevo compuesto DEND-CURC (g-2) OH en comparación

con una mezcla de curcumina / ácido piperico en un modelo murino de diabetes.
Tesis para obtener en título de QFB. UNAM.

27. **De Fronzo R.** 2009. From the triumvirate to the omnious octet: a new paradigm for the treatment of type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes*. 58:773-795.
28. **den Heijer T, Vermeer S, van Dijk E, Prins N, Koudstaal P, Hofman P, Breteler M.** 2003. Type 2 diabetes and atrophy of medial temporal lobe structures on brain. MRI, *Diabetologia*. 46: 1604-1610.
29. **Díaz-Flores M, Baiza-Gutman A, Ibañez-Hernandez MA, Pascoe-Lira D, Guzman-Greenfer A, Kumat-Rodriguez J.** 2004. Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica. *Gacerta Medica de Mexico*.140 (4):437-447.
30. **Dirección General de Información en Salud de la SSA.** 2005.
31. **Duarte A, Candeias E, Correia S, Santos R, Carvalho C, Cardoso S, Placido A, Santos M, Oliveira C, Moreira P.** 2013. Crosstalk between diabetes and brain: glucagón-like peptide-1 mimetics as a promising therapy against neurodegeneration. *Biochim. Biophys. Acta* 1832: 527-541.
32. **El-Mir M, Nogueira V, Fontaine E, Avérett N, Rigoilet M & Leverve X.** 2000. Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *Biol Chem*. 275:223-228.
33. **El-Mir M, Detaille D, R-Villanueva G, Delgado-Esteban M, Guigas B, Attia S, Fontaine E, Almeida A & Leverve X.** 2008. Neuroprotective role of antidiabetic Drug metformin against apoptotic cell death in primary cortical neurons. *Journal of molecular neurosciences*. Vol.34 (1): 77-87.
34. **Esterbauer H, Schaur R, Zollner H.** 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hidroxynonenal, malonaldehyde and relates aldehydes. *Free radical. Biol.Med*.41 (11):81-128.
35. **Fatt M, Hsu K, He L, Wondisford F, Miller F, Kaplan D & Wang J.** 2015. Metformin acts on two different molecular pathways t enhance adult neural precursor proliferation/self-renewal and differentiation. *Stem Cells Report*.5: 988-995.
36. **Federación Internacional de Diabetes.** 2017. Atlas FID. 8va edición.
37. **Finkel T, Holbrook N.** 2000. Oxidants oxidative stress and the biology of aging. *Nature*. 408: 239-247.
38. **Gao B, Zhang X, Han R, Zhang T, Chen C, Qin Z et al.** 2013. The endoplasmic reticulum stress inhibitor salubrinal inhibits the activation of autophagy and

- neuroprotection induced by brain ischemic preconditioning. *Acta Pharmacol Sin.* 34: 657–666.
39. **Gong L, Goswami S, Giacomini K, Altman R, Klein T.** 2012. Metformin pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenet Genomics.* 22(11): 820-817.
 40. **Green K, Brand MD, Murphy M.** 2004. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes Vol.* 53 (1).
 41. **Gupta A, Bisht B & Dey C.** 2011. Peripheral insulin-sensitizer drug metormin ameliorates neural insulin resistance and Alzheimer´s-like changes. *Neuropharmacology.*60:910-920.
 42. **Hardie D.** 2003. Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinology.*144: 5179-5183.
 43. **He C, Zhu H, Li H, Zou M, Xie Z.** 2013. Dissociation of Bcl-2-Beclin1 complex by activated AMPK enhances cardiac autophagy and protects against cardiomyocyte apoptosis in diabetes. *Diabetes.* 62: 1270-1281.
 44. **Hernández et al.** 2011. Tratamiento farmacológico de la prediabetes. *Revista cubana de endocrinología.* 22 (1): 36-45.
 45. **Hernández-Ávila M, Gutiérrez J, Reynoso-Noverón N.** 2013. Diabetes mellitus en México. El estado de la epidemia. *Salud Pública Mex.* 55 (2):129-136
 46. **Huang Y, Li W y Kong A.** 2012. Anti-oxidative stress regulator, NF-E2-related factor 2 mediates the adaptative induction of antioxidant and detoxifying enzymes by lipid peroxidation metabolite 4-hidroxyononal. *Cell & Bioscience.* 2 (1).
 47. **Hundal R, Krssak M, Dufur S, Laurent D, Lebon V, Chandramoulu V, Inzucchi S, Schumann W, Petersen K, Landau B, Shulman G.** 2000. Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. *Diabetes.* 49: 2063-2069.
 48. **Jiang T, Yu J, Zhu X, Wang H, Cao L, Zhang Q, Go L, Shi J, Zhang Y, Tan L.** 2014. Acute metformin preconditioning confers neuroprotection against focal cerebral ischemia by pre-activation of AMPK-dependent autophagy. *British Journal of Pharmacology.*171: 3146-3157.
 49. **Jiang T, Yu J, Zhu X, Wang H, Tan M, Cao L, Zhang Q, Gao L, Shi J, Zhang Y & Tan L.** 2014. Acute metformin preconditioning confers neuroprotection against focal cerebral ischemia by pre-activation of AMPK-dependent autophagy. *British Journal of Pharmacology.* 171: 3146-3157.

50. **Johanse S, Harris K, Rychly D, Ergul A.** 2005. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovas Diabetol.* 4: 5-16
51. **Keller N, Pang Z, Geddes J, Begley G, Germeyer A, Waer G & Mattson M.** 1997. Impairment of glucose and glutamate transport and induction of mitochondrial stress and dysfunction in synaptosomes by amyloid β -peptide: Role of the lipid peroxidation product hydroxynonenal. *J. of Neurochem.* 67:273-279.
52. **Khallaghi B, Sfarian F, Nasoohi S, Ahmadiani A & Dargahi L.** 2016. Metformin-induced protection against oxidative stress is associated with AKT/mTOR restoration in PC12 Cells. *Life Sciences.* 148: 286-292.
53. **Khang R, Park C, Shin J.** 2014. The biguanidine metformin alters phosphoproteomic profiling in mouse brain. *Neuroscience letters.* 579:149-150.
54. **Koo I, Yong K, Jung E, Hoon J, Won J, Won M, Sung Y & Kyung S.** 2010. Metformin normalizes type 2 diabetes- induced decrease in cell proliferation and neuroblast differentiation in the rat dentate gyrus. *Neurochem.*35:645-650.
55. **Kumar J & Menon V.** 1993. Effect of diabetes on levels of lipid peroxides and glycolipids in rat brain. *Metabolism.* 42:1435-1439.
56. **Labuzek K, Suchi D, Gabryel B, Bielecka A, Liber S, Okopien B.** 2010. quantification of metformin by the HPLC method in brain regions, cerebrospinal fluid and plasma of rat treated with lipopolysaccharide. *Pharmacol. Rep.*62: 956-965.
57. **Lamichhane S, Bastola T, ParuyarR, Lee E, Lee H, Lee D & Seo J.**2017. ROS production and ERK activity are involved in the effects of D- β -Hydroxybutyrate and metformin in a glucose deficient condition. *International Journal of molecular Sciences.* 18.
58. **Li J, Deng J, Sheng W & Zuo Z.** 2012. Metformin attenuates Alzheimer's disease-like neuropathology in obese, leptin-resistant mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 101 (4): 564-574.
59. **Logie L, Harthill J, Patel K, Bacon S, Hamilton D, Macrae K, McDougall G, Wang H, Xue L, Jiang H, Sakamoto K, Prescott A, Rena G.** 2012. Cellular response to the metal-binding properties of metformin. *Diabetes.* 61:1423-1433.
60. **Luchsinger J.** 2012. Type 2 diabetes and cognitive impairment: linking mechanisms. *Journal of Alzheimer's disease.* 30 (2): 185-108.

61. **Magistretti P, Pellerin L.** 1996. Cellular mechanisms of brain energy metabolism. Relevance to functional brain imaging and to neurodegenerative disorders. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 777: 380-387.
62. **Manzi, C. et al.** 2004. Copper-induced formation of reactive oxygen species causes cell death and disruption of calcium homeostasis in trout hepatocytes. *Toxicology.* 196 (1): 57-64.
63. **Matsuzaky S. & Humphries K.** 2015. Selective Inhibition of deactivated mitochondrial complex I by biguanides. *Biochemistry.* 54 (11):2011-2021.
64. **Mc Cord J.** 2000. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med.* 108: 652-659.
65. **McNeilly A, Williamson R, Balfour D, Stewart C & Sutherland C.** 2012. A high – fat-diet induced cognitive deficits in rats that is not prevented by improving insulin sensitivity with metformin. *Diabetologia.* 55: 3061-3070.
66. **Michelle C, Monette M & Anne B.** 2014. A meta-analysis of cognitive functioning in nondemented adults with type 2 diabetes mellitus. *Can J Diabetes.* 38: 401-408.
67. **Mijnhout P, Scheltens M.** 2006. Diabetic encephalopathy: a concept in need of a definition. *Diabetologia.* 49 (6):1447-1448.
68. **Mohamed A, Bierhaus A, Schiekofe S, Ziegler R, Nawroth P.** 1999. The role oxidative stress and NF- λ B activation in late diabetic complications. *Biofactors.* 10 (2-3): 157-167.
69. **Mojtaba M, Niazmand S, Hosseini M, Hassanzadeh Z, Reza H, Vafae F & Keshavarzi.** 2015. Beneficial effects of Teucrium polium and metformin on Diabetes-Induced Memory Impairment and Brain Tissue Oxidative Damage in rats. *International Journal of Alzheimer’s Disease.* 8
70. **Moreno-Altamirano L y Limón-Cruz D.** 2009. Panorama general y factores asociados a la diabetes. *Rev Facultad de Medicina, UNAM.* 52:219-23.
71. **Moreno-Altamirano L, García J., Soto-Estrada, Capraro y Limon-Cruz D.** 2014. Epidemiología y determinantes sociales asociados a la obesidad y la diabetes tipo 2 en México. *Revista Médica del hospital General de México.* pp 10
72. **Mujica F.** 2016. Drogas antidiabéticas diferentes a la insulina. Mecanismo de acción. *Academia Biomedica digital. Universidad Central de Venezuela.* No. 66.
73. **Muller S, Denet, S, Candiloros H, Barrois R, Wiernsperger N, Donner M, Droin P.** Action of metformin on erythrocyte membrane fluidity in vitro and in vivo. *Eur J Pharmacol.* 337:103-110.

74. **Murphy M.** 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J.* 417:1-13
75. **Muriach M, Flores-Bellver M, Romero F, Barcia J.** 2014. Diabetes and the brain: oxidative stress, inflammation and autophagy. *Oxidative medicine and cellular longevity.*
76. **Nelson P, Smith C, Abner E, Schmitt F, Scheff S, Davis G, Keller J, Jicha G, Davis D, Wang-Xia W, Hartman A, Katz D. Markesbery W.**2009. Human cerebral neuropathology of type 2 diabetes mellitus, *Biochim, Biophys. Acta* 1792. 454-469.
77. **Olmos P, Araya-del-Pino A, González C, Laso P, Ibarra V, rubio L.** 2009. Fisiopatología de la retinopatía y nefropatía diabéticas. *Revista médica de Chile.*137 : 1375-1384.
78. **Organización Mundial de la Salud.** 2016a. Reporte global sobre la diabetes.
79. **Organización Mundial de la Salud.** 2016b. Perfiles de los países para la diabetes.
80. **Ortiz-Avila O, Esquivel-Martínez M, Olmos-Orizaba B, et al.** 2015. Avocado oil improves mitochondrial function and decreases oxidative stress in brain of diabetic rats. *J Diabetes Res* .
81. **Ott A, Stolk R, van Harskamp F, Pols H, Hofman A, Breteler M.** 1999. Diabetes mellitus and the risk of dementia: the Rotterdam study. *Neurology.* 53: 1937-1942.
82. **Owen M, Doran E, Halestrap A.** 2000. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem.* 348: 607-614
83. **Palenickova E, Cahova M, Drahota Z, Kazdova L & Kalous M.** 2011. Inhibitory effect of metformin on oxidation of NADH-dependent substrates in rat liver homogenate. *Physiol res.* 60:835-839.
84. **Patil S, Jain, P, Ghumatkar P, Tambe R & Sathaye S.** 2014. Neuroprotective effect of metformin in MPTP-induced Parkinson's disease in mice. *Neuroscience.* 277: 747-754.
85. **Peila R, Rodriguez P, Launer L.** 2002. Type 2 diabetes, APOE gene, and the risk for dementia and related pathologies: the Honolulu-Asa aging study *Diabetes.* 51: 1256-1262.
86. **Pellerin L, Magistretti P.** 1994. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91: 10625–10629.

87. **Perissinotti P.** 2010. Caracterización y modulación del reciclado vesicular en placa neuromuscular de ratón. Tesis para obtener el grado de doctor Universidad de Buenos Aires.
88. **Picone P, Nuzzo D, Caruana L, Messina E, Barera A, Vasto S & Di Carto M.** 2015. Metformin increases APP expression and processing via oxidative stress, mitochondrial dysfunction and NF- κ B activation: use of insulin to attenuate metformin's effect. *Biochimica et biophysica acta*.1853:1046-1059.
89. **Pourahmad J, O'Brien.** 2000. A comparison of hepatocyte cytotoxic mechanism for Cu^{2+} and Cd^{2+} . *Toxicology*. 143: 263-273.
90. **Rojas E, Molina R & Rodríguez, C.** 2012. Definición, clasificación y Diagnóstico de la Diabetes Mellitus. *Revista Venezolana de Endocrinología y Metabolismo*. 10 (1).
91. **Rojas E, Molina R, Cruz R.** 2012. Definición, clasificación y diagnóstico de diabetes mellitus. *Revista Venezolana de Endocrinología y Metabolismo*. 10 (1):12.
92. **Ronnett G, Ramamurthy S, Kleman A, Landree L, Aja S.** 2009. AMPK in the brain: its roles in energy balance and neuroprotection. *J. Neurochem*. 109. Supp.1: 17-23
93. **Schaur R.** 2003. Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal. *Molecular Aspects of Medicine*. 24 (45): 149-159.
94. **Shin S, Cho L, Kim S.** 2009. Resveratrol protects mitochondria against oxidative stress through AMP-activated protein kinase –mediated glycogen synthase kinase-3 β inhibition downstream of poly (DP-ribose) polymerase-LKB1 pathway. *Mol pharmacol*. 76:884-895.
95. **Sommerfield J, Deary J, Frier B.** 2004. Acute hyperglycemia alters mood state and impairs cognitive performance in people with type 2 diabetes. *Diabetes care*. 27 (10): 2335-2340.
96. **Stewart R., Liolitsa D.** 1999. Type 2 diabetes mellitus, cognitive impairment and dementia, *Diabet. Med*.16: 93-112.
97. **Thanhthaeng N, Rutledge M, Wong J, Vann P, Forster M & Sumien N.** 2017. Metformin impairs spatial memory and visual acuity in old male mice. *Ageing and disease*. 8(1): 17-30.
98. **Uchida K, Earl R.** 1992. Covalent attachment of 4-Hydroxynonenal to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Journal of biological chemistry*. 268 (9): 6388-6393
99. **United Nations.** World Population Prospect, the 2014 revision. New York: United Nations.

100. **Valco M, Morris H & Cronin T.** 2005. Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Current Medical Chemistry*. 12:1161-1208.
101. **Vazdar M, Jukiewicz P, Hof M, Junwirt P & Cwiklik L.** 2012 Behavior of 4-hydroxynonenal in phospholipid membranes. *J. Phys. Chem. B*.116 (22):6411–6415
102. **Venna V., Li J, Hammond M, MAncini N & McCullough.** 2014. Chronic metformin treatment improves pos-stroke angiogenesis and recovery after experiments stroke. *Eur J Neurosci* .39 (12): 2129-2138.
103. **Villalpando S. Rojas R, Shamah-Levy T, Avila MA, Gaona B. De la Cruz V, Rebollar R, Hernández L.** 2010. Prevalence and distribution of type 2 Diabetes mellitus in Mexican adult population. A probabilistic survey. *Salud publica Mex*; vol. 52 suppl I:s19-s26.
104. **Viollet B, Guigas B, Sanz Garcia N, Leclerc J, Foretz M, Andreelli F.** 2012. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin. Sci*. 122:253-270
105. **Wang J, Gallagher D, DeVit L, Cancino G, Tsui D, He L. Keller G, Frankland P, Kaplan D & MillerD.** 2012. Metformin activates an atypical PKV-CBP Pathway to promote neurogenesis and enhance spatial memory formation. *Cell Stem Cell*. Pp:23-25.
106. **Wang J, Xiao B, Han F & Shi Y.** 2017. Metformin alleviated the neuronal oxidative stress in hippocampus of rats under single prolonged stress.*j Mol Neurosci*. 63:28-35
107. **Wong E, Backholer K, Gearon E, Harding J, Freak-Poli R, Stevenson C, Peeters A.** 2013. Diabetes and risk of physical disability in adults: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Diabetes endocrinology*. 1(2):106-114.
108. **World Health Organization.** 1999. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes mellitus and its complications.
109. **Yamagishi S.** 2011. Role of advanced glycation end products (AGEs) and receptor for AGEs (RAGE) in vascular damage in diabetes. *Exp Gerontol*. 46(4): 217-224.
110. **Yang Y, Zhu B, Zheng F, Li Y, Zhang Y, Hu Y & Wang X.** 2017. Chronic metformin treatments facilitates seizure termination. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 484: 450-455.

111. **Zhang Z, Zheng Z, Kan H, Song Y, Cui W, Zhao G, et al.** 2011. Reduced risk of colorectal cancer with metformin therapy in patients with type 2 diabetes: a meta-analysis. *Diabetes care*. 34 (10):2323-8.
112. **Zhao R, Xu X, Xu F, Xu F, Zhang W, Zhang W, Liu L & Wang W.** 2014. Metformin protects against seizures, learning and memory impairments and oxidative damage induced by pentylenetetrazol-induced kindling in mice. *Biochemical and Biophysical Research communications*. 448: 414-417.
113. **Zhou W, Kavelaars A & Heijnen C.** 2016. Metformin prevents cisplatin-induced cognitive impairment and brain damage in mice. *PLoS ONE*. 11 (3).

