

# **Estudio conductual neurológico y de actividad motora de ratas con diabetes tipo 1 y lesionadas con un agonista a N-metil-D-Aspartato**

## **REPORTE DEL SERVICIO SOCIAL**

**Lugar de realización:** Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”. Departamento de Neuroquímica.

**Periodo:** Septiembre del 2017 - Marzo del 2018

**División:** Ciencias Biológicas y de la Salud

**Licenciatura:** Química Farmacéutica Biológica

## **PRESENTA**

**Alumno:** Daniel Sánchez Benítez

**Matrícula:** 2143074580

**Asesor interno:** Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda

**Número Económico:** 16190

**Asesor externo:** Dra. Francisca Pérez Severiano

**Número de Cédula Profesional:** 1931927

## **ÍNDICE**

- 1. Introducción**
- 2. Marco Teórico**
  - 2.1 Diabetes**
  - 2.2 Diabetes en México**
  - 2.3 Modelos de estudio**
    - 2.3.1 Estreptozotocina**
      - 2.3.1.1 Mecanismo de acción**
  - 2.4 Desórdenes cognitivos generados por la Diabetes**
  - 2.5 Agonista NMDA en la generación de un estado neurodegenerativo (QUIN)**
  - 2.6 GAD65**
- 3. Hipótesis**
- 4. Objetivo general**
- 5. Objetivos específicos**
- 6. Metodología**
- 7. Resultados y Discusión**
  - 7.1 Estandarización del modelo de DMI**
  - 7.2 Evaluación de la coordinación motora**
  - 7.3 Evaluación de la actividad espontánea**
  - 7.4 Evaluación conductual en un modelo de excitotoxicidad inducido por QUIN**
  - 7.5 Evaluación de la expresión de GAD65**
- 8. Conclusiones**
- 9. Referencias**

## 1. Introducción

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la Diabetes como una enfermedad crónica que aparece cuando el páncreas no puede producir suficiente insulina o cuando el organismo es incapaz de reconocerlo, un mal control de esta enfermedad, da como resultado un estado hiperglucémico que desencadena niveles altos de azúcar en el cuerpo, los cuales no pueden ser controlados al haber una deficiencia o ausencia de insulina en el cuerpo. La diabetes se está convirtiendo rápidamente en la epidemia del siglo XXI y en un reto de salud global. Estimaciones de la OMS indican que, de 1995 a la fecha casi se ha triplicado el número de personas que viven con diabetes, con una cifra actualmente estimada en más de 347 millones de personas. De acuerdo con la Federación Internacional de la Diabetes (FID), los países con mayor número de diabéticos son: China, India, Estados Unidos, Brasil, Rusia y México (Hernández Avila, Pablo Gutiérrez, & Reynoso Noverón, 2013). Existen 3 tipos de diabetes siendo la *Diabetes tipo 1 (DMI)* la única causada por una reacción autoinmune, en la que el sistema de defensas del organismo ataca las células productoras de insulina del páncreas, por lo que es incapaz de producir la insulina que necesita. También se clasifica en: *Diabetes tipo 2 (DMII)* y *Diabetes Mellitus Gestacional (DMG)* (International Diabetes Federation, 2015).

Estudios tanto en humanos como en animales, expresan que la diabetes está asociada con cambios patológicos en el sistema nervioso central (SNC) que conducen a deficiencias cognitivas, y un mayor riesgo de complicaciones vasculares en el cerebro. Se han identificado anomalías en el aprendizaje y la memoria, la plasticidad sináptica y la neurotransmisión glutamatérgica. En general, las observaciones en modelos caracterizados por hiperglucemia crónica e hipoinsulinemia (referidos como modelos de DMI) son bastante consistentes, y estos modelos se utilizan cada vez más para estudiar la patogénesis y desarrollar nuevos tratamientos (Biessels & Gispen, 2005). En modelos experimentales de DMI provocado por estreptozotocina (STZ) en ratas, se observa que en el hipocampo hay una reactividad aumentada de los astrocitos, alteraciones en la plasticidad sináptica, cambios vasculares, disminución de la complejidad dendrítica y perturbación de la neurotransmisión (Magariños & McEwen, 2000).

Los receptores a NMDA han sido estudiados por su participación en la regulación de la plasticidad sináptica, aprendizaje, psicosis y muerte celular como ocurre en varias condiciones neuropatológicas y enfermedades neurodegenerativas. Tomando como base estos antecedentes, en el presente estudio se analizará el efecto de un agonista a los receptores a NMDA, como lo es el ácido quinolínico (QUIN) inyectado en el estriado de ratas diabéticas.

La relación que existe entre la sensibilidad de los receptores de NMDA y la diabetes, se vincula con la interrupción de la homeostasis glucémica, afectando la disponibilidad de nutrientes en las neuronas, alterando su función neuronal y contribuyendo en la neurodegeneración y déficit motor. Por lo anterior, a los animales diabéticos y lesionados intraestriatalmente con el agonista a NMDA se les evaluó la conducta rotatoria midiendo los giros ipsilaterales (provocados por un agonista a los receptores dopaminérgicos; apomorfina), así como los parámetros de actividad motora, empleando un equipo VariMex que midió la actividad espontánea y un RotaRot que evaluó la coordinación motora.

En la patogénesis de la DMI destaca la formación de autoanticuerpos contra antígenos de las células  $\beta$  pancreáticas como la glutamato Descarboxilasa (isoenzima GAD65 kDa). Los autoanticuerpos GAD65 pueden predecir con precisión el desarrollo de la DMI en combinación con otros biomarcadores humorales sustitutos (Townes & Pietropaolo, 2011). En el siguiente estudio se realizó una evaluación a la expresión de la proteína GAD65 por Western Blot en el estriado de las ratas de nuestros grupos experimentales.

## **2. Marco teórico**

### **2.1 Diabetes**

La FID define a la diabetes como una afección crónica que se desencadena cuando el organismo pierde su capacidad de producir suficiente insulina o de utilizarla con eficacia. La insulina es una hormona producida en el páncreas y que permite que la glucosa de los alimentos pase a las células del organismo, en donde se convierte en energía para que funcionen los músculos y tejidos. Consecuentemente, en una persona con diabetes no logra absorber la glucosa adecuadamente, de tal manera que ésta queda circulando en la sangre causando un estado hiperglucémico, dañando así los tejidos con el paso del tiempo. Este deterioro causa complicaciones para la salud potencialmente letales (International Diabetes Federation, 2015). Existen 3 tipos de diabetes:

**Diabetes tipo 1 (DMI):** causada por una reacción autoinmune, en la que el sistema de defensas del organismo ataca las células productoras de insulina del páncreas, por lo que es incapaz de producir la insulina que necesita.

**Diabetes tipo 2 (DMII):** En la diabetes tipo 2, el organismo puede producir insulina pero, o bien no es suficiente, o el organismo no responde a sus efectos, provocando una acumulación de glucosa en la sangre.

**Diabetes Mellitus Gestacional (DMG):** se presenta solo en mujeres y es llamada así cuando se le diagnostica diabetes por primera vez durante el embarazo. La DMG suele presentarse en una etapa avanzada y surge debido a que el organismo no puede producir ni utilizar la suficiente insulina necesaria para la gestación (International Diabetes Federation, 2015).

Las personas pueden experimentar diferentes signos y síntomas de la diabetes, y en ocasiones puede que no haya signos. Algunos de los síntomas más comunes son: Micción fuerte, sed excesiva, aumento del hambre, pérdida de peso, cansancio, falta de interés y concentración; sensación de hormigueo o entumecimiento en las manos o los pies, visión borrosa, infecciones frecuentes, curación de heridas lenta, vómitos y dolor de estómago, entre otros.

### **2.2 Diabetes en México**

La diabetes se está convirtiendo rápidamente en la epidemia del siglo XXI y en un reto de salud global. Estimaciones de la OMS indican que de 1995 a la fecha casi se ha triplicado el número de personas que padecen diabetes, con una cifra actualmente estimada en más de 347 millones de personas. De acuerdo con la FID, los países con mayor número de

personas diabéticas son: China, India, Estados Unidos, Brasil, Rusia y México (Hernández Avila, Pablo Gutiérrez, & Reynoso Noverón, 2013).

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad cuya prevalencia mundial ha incrementado en los últimos años. En México, la diabetes se ha convertido en la primera causa de muerte al contribuir con 12% del total de muertes. Se estimó que para el año 2030 habrá una prevalencia nacional de 10.9%; tan sólo en el año 2002 se registraron 114.6 nuevos casos por cada 100,000 habitantes (Hernández Romieu, et al., 2011).

### **2.3 Modelos de estudio**

Los modelos animales se han usado ampliamente en la investigación de la diabetes. Los primeros estudios utilizaron perros pancreatectomizados para confirmar el papel central del páncreas en la homeostasis de la glucosa, que culminó con el descubrimiento y la purificación de la insulina. Hoy en día, la experimentación animal es polémica y está sujeta a restricciones legales y éticas que varían en todo el mundo. La mayoría de los experimentos se llevan a cabo en roedores, aunque algunos estudios aún se realizan en animales más grandes (Rees & Alcolado, 2005). Existen numerosos modelos biológicos en animales que reproducen varias de las manifestaciones clínicas de la diabetes humana mediante diversos métodos, entre los cuales se destaca la inducción química con STZ en roedores. Este fármaco provoca la destrucción selectiva de las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos, única fuente de insulina en el organismo (Bequer, et al., 2016)

Estudios tanto en humanos como en animales, expresan que la diabetes está asociada con cambios patológicos en el SNC que conducen a deficiencias cognitivas, y un mayor riesgo de complicaciones vasculares en el cerebro. Se han identificado anomalías en el aprendizaje y la memoria, la plasticidad sináptica y la neurotransmisión glutamatérgica. En general, las observaciones en modelos caracterizados por hiperglucemia crónica e hipoinsulinemia (referidos como modelos de DMI) son bastante consistentes, y estos modelos se utilizan cada vez más para estudiar la patogénesis y desarrollar nuevos tratamientos (Biessels & Gispen, 2005).

En modelos experimentales de DMI provocado por STZ en ratas, se observa que en el hipocampo hay una reactividad aumentada de los astrocitos, alteraciones en la plasticidad sináptica, cambios vasculares, disminución de la complejidad dendrítica y perturbación de la neurotransmisión (Magariños & McEwen, 2000). Por otro lado, está reportado que en el cerebro de ratas diabéticas, las subunidades del receptor a N-metil-D-aspartato (NMDA) están modificadas transcripcional y postraduccionalmente, por lo que alteraciones en la plasticidad sináptica son desarrolladas de manera gradual y la insulina previene parcialmente esos déficits (Bean, Zheng, Patel, & Monaghan, 2006).

#### **2.3.1 La STZ como modelo de DMI en rata**

La DMI en humanos se caracteriza por una destrucción específica de las células  $\beta$  pancreáticas, comúnmente asociada con daño mediado por el sistema inmune. Aunque el daño puede ocurrir de forma silenciosa a lo largo de muchos años, en la presentación clínica hay poca masa celular  $\beta$  superviviente y el trastorno avanza a insulinopenia. La STZ es un derivado de la nitrosourea aislado de *Streptomyces achromogenes* con actividad antibiótica y antineoplásica de amplio espectro. Es un potente agente alquilante que ha demostrado interferir con el transporte de glucosa, tiene función de glucocinasa e induce múltiples roturas de cadenas de DNA. Una única dosis concentrada de estreptozotocina

puede producir diabetes en roedores, probablemente como resultado de efectos tóxicos directos. En los roedores susceptibles esto induce una diabetes insulino-pénica en la que la destrucción inmunológica juega un papel, como en la DMI humana. El modelo de dosis múltiples de estreptozotocina en dosis bajas se ha utilizado ampliamente para estudiar las vías inmunológicas que conducen a la insulinitis y la muerte de las células  $\beta$ . Sin embargo, el agente producirá diabetes incluso en ausencia de células T y B funcionales (Rees & Alcolado, 2005).

### **2.3.1.1 Mecanismo de acción de la STZ**

La STZ entra a la célula  $\beta$  por el transportador GLUT 2 y causa alquilación del DNA y ATP. Se ha observado en experimentos que también el Óxido Nítrico (ON) contribuye a la destrucción de las células  $\beta$  del páncreas, así como las especies de oxígenos reactivos que contribuyen a la fragmentación del DNA y evocan a otros cambios deletéreos en las células. La formación de aniones superóxido resultan de la acción de la STZ sobre la mitocondria y el aumento de la actividad de la xantina oxidasa; está demostrado que la STZ inhibe el ciclo de Krebs y disminuye el consumo de oxígeno de la mitocondria, provocando disminución del ATP. El daño al DNA por la STZ induce la activación de poliribosilación del ADP que lleva a la depleción de  $\text{NAD}^+$  y ATP (Plascencia & López, 2006).

## **2.4 Desórdenes cognitivos generados por la Diabetes**

La insulina regula la captación de glucosa y el almacenamiento en los tejidos periféricos, y está demostrado que la insulina actúa dentro del hipotálamo para regular de forma aguda la ingesta de alimentos y el metabolismo. La modulación para la transducción de la señalización de la insulina está también presente en otras áreas del cerebro, particularmente en el hipocampo, pero un papel fisiológico de la insulina del cerebro fuera del hipotálamo no se ha establecido. Estudios recientes sugieren que la insulina puede ser capaz de modular funciones cognitivas incluyendo la memoria (McNay et al, 2010). Existe mucha evidencia sobre el impacto negativo de la diabetes en las habilidades cognitivas, los pacientes con diabetes mellitus presentan un alto factor de riesgo para el desarrollo de problemas cognitivos en comparación con personas sanas (Szamosközi & Kinga, 2014).

Los pacientes con diabetes tienen un alto riesgo de padecer trastornos cognitivos, el patrón exacto y la magnitud de esto todavía no están claros. Aunque la magnitud de los efectos que se pueden provocar en las funciones cognitivas generalmente oscilan entre valores bajos y moderados, aun así, deben ser considerados ya que pueden comprometer las actividades diarias (Bruehl, et al., 2014). De igual manera otras enfermedades crónicas además de la diabetes, como las enfermedades cardiovasculares y la hipertensión, se consideran factores de mayor riesgo para la disminución de las capacidades intelectuales.

La diabetes, a diferencia de otras enfermedades crónicas, requiere un extraordinario esfuerzo para el autocontrol, lo que puede producir un estrés psicosocial y psicológico añadido que afectaría de manera desfavorable al enfermo con esta patología. Por ello, la diabetes es una enfermedad que requiere grandes ajustes en el estilo de vida y una amplia educación del paciente (Martínez, et al., 2002). Específicamente la DMI, que es la que se origina en la infancia representa un menor porcentaje en comparación con la DMII, sin embargo, corresponde a un problema de salud pública puesto que es la principal enfermedad crónica padecida en menores de 18 años. Al ser su inicio en etapas tempranas

este descontrol de la glucosa podría impactar desde el neurodesarrollo, irrumpiendo así en un momento crítico para la adquisición de capacidades cognitivas y aún en ausencia de un deterioro cognitivo clínicamente demostrable podría causar diferencias en el desempeño de dichas capacidades (Jimenez, 2016).

### **2.5 Agonista NMDA en la generación de un estado neurodegenerativo (QUIN)**

El ácido quinolínico (ácido 2,3-piridin bicarboxílico) es una molécula endógena producida por el catabolismo del triptófano a través de la vía de la kinurenina, produce disminución en el número de axones en el cuerpo estriado. Esta vía catabólica tiene como producto final la síntesis de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD<sup>+</sup>), y se ha reportado que está presente principalmente en el hígado y en el tejido nervioso de humanos, primates no humanos, roedores y otros mamíferos. (Fuentes-Bello, et al., 2013; Schwarcs, Muchowski, Wu, 2012; Potter, 2010; Huidobro & Picazo, 2005).

La importancia de esta vía radica en que se estima que en el SNC de los mamíferos más del 90% de triptófano es metabolizado a través de ésta, además de la producción de algunos metabolitos intermediarios con propiedades neuroactivas (ácido kinurénico y QUIN) (Pérez, et al., 2012). El QUIN posee distintos mecanismos de toxicidad; aunque también actúa como un agonista directo de los receptores NMDA, principalmente de tipo NR2A y NR2B, generando daño neuronal por excitotoxicidad, pero además puede formar complejos con el Fe<sup>+2</sup> induciendo la formación directa de radicales libres como hidroxilos (OH<sup>-</sup>), y es capaz de inhibir la recaptura de glutamato por parte de las células gliales, aumentando las concentraciones de glutamato y exacerbando el proceso de excitotoxicidad (Santamaría & Jiménez, 2005). Su naturaleza endógena y tóxica del QUIN lo ha llevado a involucrarse en la fisiopatología de muchos desórdenes neurológicos tanto agudos como crónicos: epilepsia, enfermedades cerebrovasculares, demencia por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y diversas enfermedades neurodegenerativas (Heyes, et al., 1992). Experimentalmente la administración intraestriatal de QUIN en roedores, constituye uno de los modelos tóxicos que más se utiliza para reproducir las alteraciones conductuales y bioquímicas que se observan en la enfermedad de Huntington, además de que es una herramienta utilizada ampliamente para generar y estudiar procesos de excitotoxicidad (Pérez, Carrillo & Santamaría, 2010). Sin embargo, este agente es capaz de dañar otras áreas cerebrales en función de su concentración, como es el caso del hipocampo (Huidobro & Picazo, 2005).

### **2.6 GAD 65**

En la patogénesis de la DMI destaca la formación de autoanticuerpos contra antígenos de las células  $\beta$  pancreáticas. Entre los antígenos que estos anticuerpos pueden reconocer se encuentra la insulina, la glutamato Descarboxilasa (isoenzima GAD65 kDa) y la tirosinafosfatasa pancreática IA2 (antígeno 2 de las células de los islotes). La GAD es una enzima que cataliza la formación de ácido gamma-aminobutírico (GABA) a partir de glutamina en los tejidos nerviosos y pancreáticos (Chen, et al., 2005). En los seres humanos existen dos isoenzimas de la GAD que reciben el nombre de su peso molecular: GAD65 y GAD67. De este modo, los autoanticuerpos siempre se dirigen contra la GAD65 y reaccionan principalmente con epítopos conformacionales. Los anticuerpos anti-GAD65 no sólo están presentes en el 70-80% de los pacientes con diabetes mellitus incipiente, sino también en pacientes con diabetes autoinmune latente del adulto (LADA, por sus siglas en inglés),

enfermedades poliendocrinas relacionadas con la diabetes y algunas enfermedades neurológicas raras, es especial el síndrome de la persona rígida (SPS) (IBL, 2011; Törn, et al., 2008). También la DMI se caracteriza por la presencia de respuestas adaptativas dirigidas a las proteínas neuroendocrinas. Una de estas proteínas es la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD). Si bien GAD está ampliamente distribuido en los tejidos neuroendocrinos, su importancia específica en la diabetes ha sido paralela a los avances en la comprensión de la inmunidad humoral y celular en la DMI y en un subconjunto de la DMII. Los autoanticuerpos GAD65 pueden predecir con precisión el desarrollo de la DMI en combinación con otros biomarcadores humorales sustitutos, y se consideran el biomarcador más sensible y específico que identifica un subconjunto de DMI clínicamente diagnosticada como LADA (Towns & Pietropaolo, 2011).

### **3. Hipótesis**

- Si la DMI presenta como consecuencia respuestas adaptativas dirigidas a las proteínas neuroendocrinas y a otras vías, entonces en el modelo de DMI en rata se presentará afección conductual y motora posterior a la lesión intraestriatal con un agonista a NMDA.

### **4. Objetivo General**

- Estudiar en ratas con DMI, la afección conductual y motora posterior a la lesión intraestriatal con un agonista a NMDA.

### **5. Objetivos específicos**

- Reproducir el modelo de DMI y determinar los parámetros de glicemia establecidos en el modelo.
- Evaluar la conducta de giro y actividad motora en ratas con DMI posterior a la lesión con QUIN.
- Proponer un mecanismo de modulación de los receptores a NMDA entre la respuesta motora y neurológica ante un estado diabético en la rata.

### **6. Metodología**

#### **Diseño experimental:**

##### *-Animales-*

Se utilizaron 24 ratas macho Wistar con un peso promedio de entre 200-250 g, fueron albergados en cajas de acrílico con encamado de aserrín previamente esterilizado y con no más de 6 ratas por caja, contando con libre acceso a alimento y agua. El manejo de las ratas fue de acuerdo con la NOM-062-ZOO-2001. Se dividió un lote de ratas en 4 grupos experimentales: 1) Grupo control con solución salina (Ctrl + SS), 2) Control con ácido quinolínico (Ctrl + QUIN), 3) Diabéticos con solución salina (DMI + SS), 4) Diabéticos con ácido quinolínico (DMI + QUIN). Se llevó un seguimiento de su peso corporal desde el primer día y cada tercer día hasta el final del experimento.

#### *-Modelo de DMI-*

Se dejaron a los grupos de experimentación sin alimento un día previo a la toma de los niveles de glucosa basal de cada una de las ratas de todos los grupos, así como a la administración de la STZ y con una solución de glucosa al 5% como sustituto de agua. Para los grupos diabéticos se preparó una solución de STZ con agua desionizada a una concentración de 10 mg/mL y se ajustó su pH a 4.5, se administró vía intramuscular a una dosis de 50 mg/kg dividida en dos mitades de las cuales fueron repartidas en cada una de las patas traseras de la rata. Para los grupos control se les administró una solución de citratos a un pH de 4.5 por la misma vía y en la misma dosis. A los 4 días de la administración de la STZ se les retiró el alimento a los grupos diabéticos así como a los grupos control y al quinto día se les midieron sus niveles de glucosa con la finalidad de confirmar su estado diabético. A los diez días después de la administración de la STZ se les realizó una curva de tolerancia a la glucosa a todos los grupos experimentales.

**Nota:** Para considerar un estado hiperglucémico en las ratas se tomaron valores de glucosa superiores a los 120 mg/dL en sangre. Cuando los valores de glucosa obtenidos a los 5 días posteriores a la administración de la STZ eran menores a los 120 mg/dL, se realizaba una segunda administración de STZ vía intramuscular a una dosis de 25 mg/kg dividida en dos mitades de las cuales fueron repartidas en cada una de las patas traseras de la rata.

#### *-Modelo de excitotoxicidad-*

Se realizó una cirugía bajo condiciones de anestesia general con Pentobarbital sódico (Pisabental®) a una dosis de 40 mg/kg por vía intraperitoneal y una dosis de 30 mg/kg para diabéticos por la misma vía. Los animales fueron colocados en el aparato estereotáxico determinando las coordenadas de inyección a partir del punto de Bregma del cráneo sumando 0.5 grados en la coordenada anterior, restando 2.7 en la coordenada lateral y restando 4.5 en la coordenada ventral, para ubicar la lesión estriatal con QUIN a una concentración de 240 nanomoles/ $\mu$ L y a una velocidad de 1  $\mu$ L/min en el lado derecho. Se le administró el QUIN a 3 ratas de cada grupo, a las restantes se les administró solución salina.

#### *-Evaluación de la coordinación motora-*

Siete días después de la lesión estriatal se realizó una evaluación de la coordinación motora de cada grupo experimental, ésta se realizó en un equipo Rota-Rod en el cual se realizó un entrenamiento previo de 3 días para una prueba final, durante 3 días consecutivos se midió el tiempo que duraban las ratas en el equipo a diferentes velocidades: 10, 20 y 30 rpm. La prueba final se realizó por duplicado al cuarto día midiendo el tiempo de duración en el equipo a una velocidad preprogramada la cual iba aumentando hasta que la prueba terminaba. La latencia de caída del rotarod y la velocidad del Rota-Rod se registraron para cada rata y se usó el promedio de los dos ensayos para el análisis estadístico. Para cada prueba, el equipo se limpió entre individuos para evitar los efectos adicionales causados por los olores del animal anterior.

#### *-Evaluación de la actividad espontánea-*

Siete días posteriores a la lesión estriatal se realizó una evaluación de la actividad espontánea a cada grupo experimental, la cual se hizo en un equipo Auto-track Opto-Varimex 4 (Columbus Instrument) previamente sanitizado con una solución de etanol al 70%. Se colocó una rata durante 30 minutos en una caja acrílica translúcida (42.2 x 42.5 x

20.5 cm) equipada con sensores de movimiento para el análisis de diferentes parámetros, movimientos horizontales (conteos totales de ejes x,y) y verticales (conteos totales de sensor de eje z) además del mapeo de la distancia total recorrida. Para cada prueba, el equipo se limpió entre individuos para evitar los efectos adicionales causados por los olores del animal anterior.

#### *-Evaluación conductual en un modelo de excitotoxicidad inducido por QUIN-*

La conducta de rotación se evaluó 7 días después de la lesión estriatal. Cinco minutos antes de la evaluación las ratas se administraron por vía subcutánea con Apomorfina a una dosis de 1 mg/kg y se colocaron en cajas de acrílico (25 x 40 x 20 cm) independientes, donde se cuantificó el número de giros ipsilaterales que realizaron durante una hora.

#### *-Sacrificio de las ratas-*

Al finalizar los tratamientos se sacrificaron a las ratas con guillotina. El cerebro se extrajo de la cavidad craneal y se disecó sobre una superficie enfriada con hielo en las siguientes regiones: cuerpo estriado, hipocampo y corteza. Las muestras posteriormente se almacenaron a -70 °C hasta el momento en el que se procedieron a efectuar las pruebas moleculares.

#### *-Detección de la expresión de la proteína GAD65 por Western Blot en el estriado de ratas-*

Para la inmunodetección de la proteína se prepararon geles de poliacrilamida, se llenaron los pozos con 5 µL de muestra así como un pozo con marcador de peso molecular, se realizó una electroforesis a 50 mV por 10 min, al haber transcurrido este tiempo se incrementó el voltaje a 150 mV y se dejó por 50 min, concluida la electroforesis las proteínas presentes en los geles fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (previamente activadas con metanol, agua destilada y buffer de transferencia), la transferencia se realizó a 120 mV durante 60 min. Se bloquearon las membranas con una solución PBS durante 90 min a temperatura ambiente y con agitación en un equipo Shaker. Se retiró la solución bloqueadora con un lavado de PBS-Tween. Se adiciono a las 2 membranas el anticuerpo primario GAD65 (Santa Cruz Biotechnology) a una dilución 1:1000, durante toda una noche a 4°C. Al día siguiente se retiró la solución con el anticuerpo primario y se realizaron 4 lavados a la membrana con PBS-Tween 0.05M. Al terminar los lavados se adiciono el anticuerpo secundario anti-rabbit (Santa Cruz Biotechnology) con una dilución 1:10000, por 90 min. Al terminar se realizan 3 lavados a la membrana con PBS-Tween 0.05M para retirar la solución del anticuerpo secundario. Se preparó una solución reveladora (500 µL de luminol y 500 µL de solución oxidante) adicionando 200 µL a cada una de las membranas. Los resultados obtenidos fueron medidos por su densidad óptica, los cuales fueron normalizados por la expresión de β-actina (que fue inmuno-detectada utilizando una dilución de 1:5000 de anticuerpo primario (Santa Cruz Biotechnology) y anticuerpo secundario anti mouse (Santa Cruz Biotechnology) a una dilución 1:3000. Las bandas obtenidas se visualizaron en un equipo fotodocumentador Fusion Solo s Vilber Lourmart y la densidad óptica medida con el programa Fusion.Ink 2015.

#### *-Análisis estadístico-*

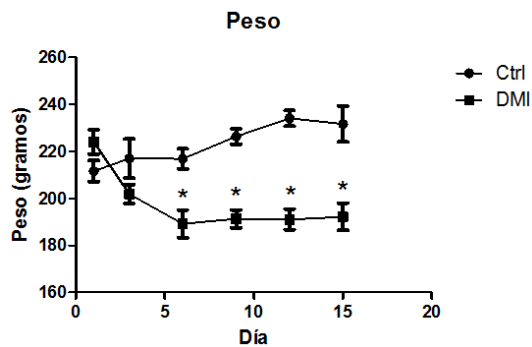
Todos los resultados se expresan con la media ± error estándar de los 4 lotes experimentales. La prueba estadística utilizada fue un ANOVA de dos factores con Tukey.

El valor de  $p < 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo. Todos los análisis se realizaron utilizando el software GraphPad 5.

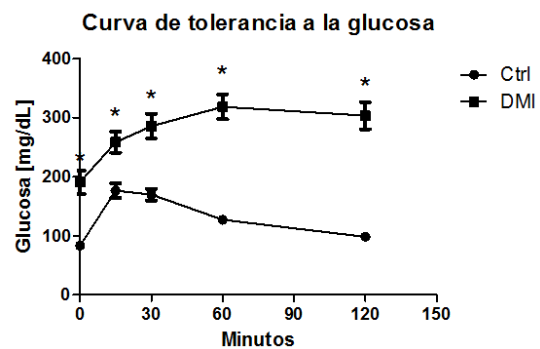
## 7. Resultados y discusión

### 7.1 Estandarización del modelo de DMI

Para la confirmación de que el modelo diabético había sido reproducido adecuadamente bajo las condiciones de laboratorio, se hizo una comparación entre los grupos experimentales DMI y Ctrl, tanto en sus pesos corporales como en sus niveles de glucosa en sangre.



**Figura 1.** Comparación del seguimiento de peso corporal entre los grupos DMI y Ctrl. Los datos expresan la media ( $n=12$ )  $\pm$  error estándar, ANOVA de dos vías. \* Diferencia significativa con el grupo Ctrl,  $p < 0.05$ .



**Figura 2.** Curva de tolerancia a la glucosa de los grupos DMI y Ctrl. Los datos expresan la media ( $n=12$ )  $\pm$  error estándar, ANOVA de dos factores. \* Diferencia significativa con el grupo Ctrl,  $p < 0.05$ .

La estandarización del modelo de diabetes fue primordial para la obtención de resultados confiables, en la comparación de los grupos experimentales se pudo observar notables diferencias que confirman el modelo de estudio.

En la Figura 1 se puede observar como el seguimiento del peso corporal entre cada grupo es distinto, para el grupo Ctrl su peso tuvo un aumento constante durante todo el experimento, sin embargo, en el grupo DMI se observó una disminución progresiva de su peso corporal, signo característico de este modelo de estudio, así como en pacientes con DMI (Barrio, 2004).

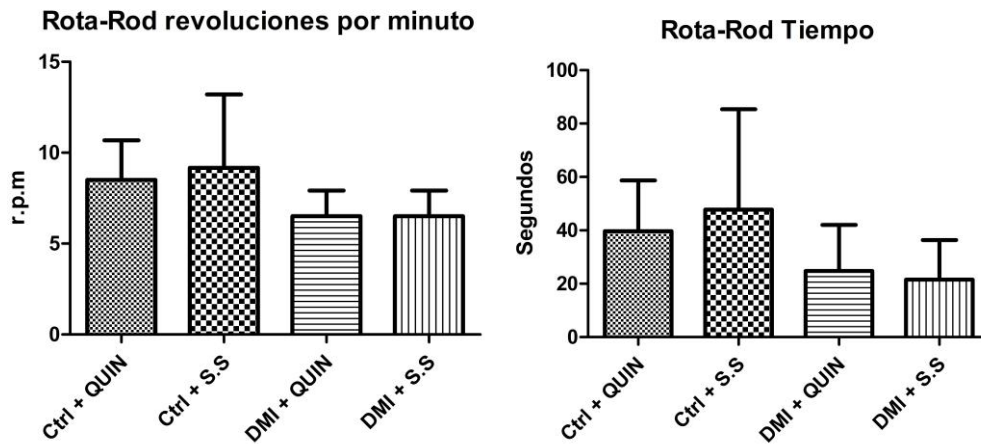
En la Figura 2 observando los niveles de glucosa basales se puede apreciar que estos están elevados en el grupo de DMI, mientras que en el grupo Ctrl no se ven estos niveles. La curva de tolerancia a la glucosa se realizó para confirmar que nuestros sujetos de estudio del grupo DMI ya no podían producir insulina, por lo que sus niveles de glucosa no podrían ser moderados, dando como resultado una curva típica de pacientes con DMI (Benzadón, Forti & Sinay, 2014), mientras que en los sujetos de estudio del grupo Ctrl sí pudieron modular sus niveles de glucosa en sangre.

### 7.2 Evaluación de la coordinación motora

La prueba de Rota-Rod se usa ampliamente para evaluar la coordinación motora de roedores y es especialmente sensible para detectar una disfunción cerebral.

El aparato consiste en una barra conectada a un motor giratorio que puede girar de manera constante o acelerada. Su uso permite observar las habilidades de coordinación motora de los roedores. El tiempo de permanencia de los roedores

sobre el cilindro en diferentes velocidades constituye una medida de su coordinación, condición física y planificación motora. Resulta muy útil conocer estas variables en los estudios psicofarmacológicos o de lesión cerebral (Sampedro, et al., 2013) & (Méndez, et al., 2008)..



**Figura 3.** Conducta en Rota-Rod en r.p.m. Los datos expresan la media  $\pm$  error estándar, ANOVA de dos factores, no se encontró diferencia significativa con respecto al grupo Ctrl; n= 2-3 por grupo,  $p < 0.05$ .

**Figura 4.** Conducta en Rota-Rod en tiempo. Los datos expresan la media  $\pm$  error estándar, ANOVA de dos factores, no se encontró diferencia significativa con respecto al grupo Ctrl; n= 2-3 por grupo,  $p < 0.05$ .

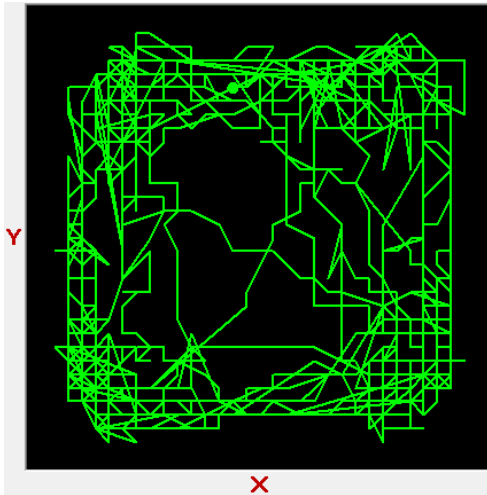
Los resultados de esta prueba se reportan con base a la velocidad del equipo, así como el tiempo de duración de cada individuo en el equipo. Comparando los grupos experimentales se puede apreciar una clara diferencia entre los grupos Ctrl con respecto a los grupos DMI, puesto que como se ve en las figuras 3 y 4, estos grupos tienen una mayor resistencia así como mayor duración en el equipo; una multitud de estudios informaron sobre el impacto negativo de la diabetes en las habilidades cognitivas, ya que los pacientes con DM presentan un factor de riesgo más alto para desarrollarlas en comparación con sujetos sanos (Szamosközi & Kinga, 2014).

En cuanto a la comparación entre los grupos Ctrl se puede observar que las ratas que no fueron lesionadas con QUIN presentan un tiempo de resistencia mayor comparadas con las ratas que sí fueron lesionadas con QUIN, ya que provoca un daño neuronal de excitotoxicidad también se le ha relacionado con enfermedades neurodegenerativas y alteraciones conductuales (Pérez, Carrillo & Santamaría, 2010).

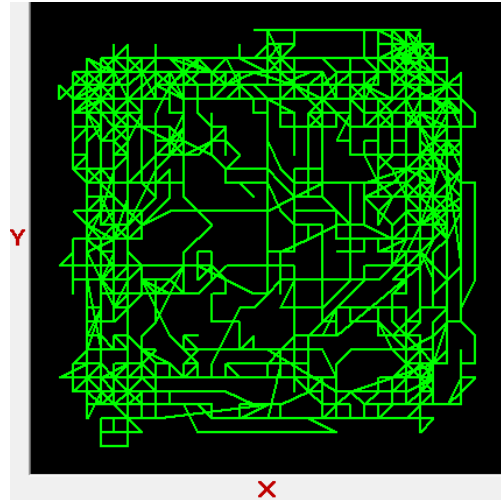
Los grupos DMI presentan una diferencia mucho menor entre las ratas lesionadas con QUIN con respecto a las que fueron lesionadas con S.S, sin embargo, las ratas lesionadas con QUIN presentaron una mayor resistencia en el equipo, puesto que se presenta una excitación excesiva en los receptores a NMDA provocados por el QUIN. Sin embargo, se ha reportado que en el cerebro de ratas diabéticas las subunidades del receptor a NMDA están modificadas transcripcional y postraduccionalmente generando menos alteraciones conductuales (Bean et al., 2006; Pérez, Carrillo & Santamaría, 2012; Pérez-Severiano, Escalante & Ríos, 1998).

### 7.3 Evaluación de la actividad espontánea

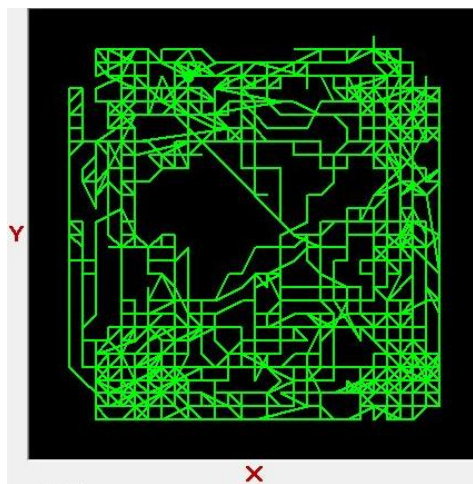
El sistema de Opto-Varimex-5 de Columbus es un medidor de actividad animal diseñado para las pruebas de ansiedad y exploración en campo abierto, donde se cuantificar la actividad locomotora y rastrea el camino del animal para el análisis del comportamiento (Columbus Instrument, 2018). La valoración de la actividad locomotora espontánea nos permite verificar mediante actividad ambulatoria, actividad vertical y tiempo de inmovilidad, si los efectos de los fármacos en estudio no están influenciados por deficiencias motrices que también pudieran indicar efectos sedantes (López-Martínez & Salgado-Zamora, 2010).



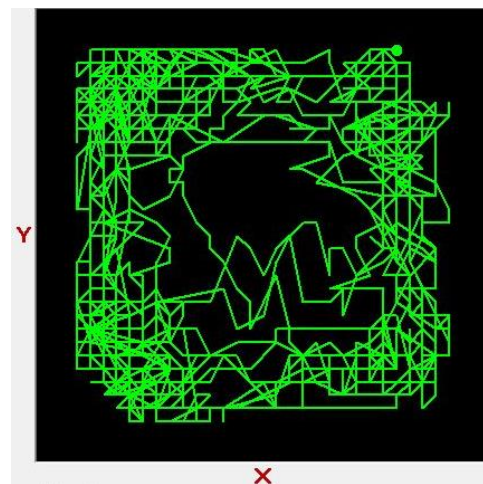
**Figura 5.** Mapa de la distancia total recorrida del grupo Ctrl + QUIN. Obtenido del equipo Auto-track Opto-Varimex 4 (Columbus Instrument)



**Figura 6.** Mapa de la distancia total recorrida del grupo Ctrl + S.S. Obtenido del equipo Auto-track Opto-Varimex 4 (Columbus Instrument)



**Figura 7.** Mapa de la distancia total recorrida del grupo DMI + QUIN. Obtenido del equipo Auto-track Opto-Varimex 4 (Columbus Instrument)



**Figura 8.** Mapa de la distancia total recorrida del grupo DMI + S.S. Obtenido del equipo Auto-track Opto-Varimex 4 (Columbus Instrument)

**Tabla 1.** Actividad motora espontánea de los grupos experimentales

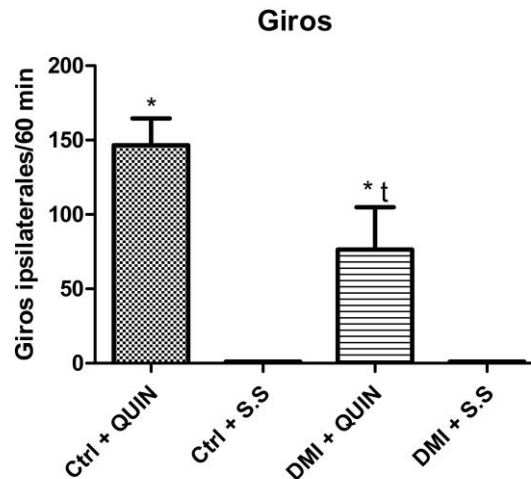
	<b>Ctrl + QUIN</b>	<b>Ctrl + S.S</b>	<b>DMI + QUIN</b>	<b>DMI + S.S</b>
<b>Distancia Recorrida (cm)</b>	1916 ± 280	2320 ± 242	2136 ± 915	2785 ± 843
<b>Movimientos ambulatorios</b>	308 ± 58	422 ± 53	329 ± 121	403 ± 70
<b>Tiempo de descanso (seg)</b>	1078 ± 72	902 ± 63	1074 ± 217	926 ± 61

El objetivo de esta prueba era poder determinar las diferencias motoras que existen entre los grupos experimentales lesionados con QUIN contra los grupos no lesionados. Los resultados obtenidos sugieren que no hay una diferencia significativa entre los mapeos de la distancia total recorrida de cada grupo (Figuras 5-8), pues no muestran una marcada diferencia. Sin embargo, en la Tabla 1 se aprecian los datos estadísticos correspondientes a cada uno de estos grupos experimentales, donde se nota la diferencia que existe entre los grupos lesionados con respecto a los no lesionados. En los grupos Ctrl, las ratas que fueron lesionadas con QUIN mostraron un mayor tiempo de descanso con respecto a las ratas no lesionadas, sin embargo, las ratas que no fueron lesionadas con QUIN presentaron un número mayor de movimientos ambulatorios así como una mayor distancia recorrida. Ya que el QUIN es una molécula que ha demostrado poseer distintos mecanismos de toxicidad; aunque también actúa como un agonista directo de los receptores NMDA, generando un daño neuronal por excitotoxicidad (Santamaría & Jiménez, 2005), lo que sugiere que las ratas Ctrl lesionadas con QUIN presentaron un daño neurodegenerativo que les impide tener una función motora adecuada con respecto a las ratas que no fueron lesionadas con QUIN. Las enfermedades neurodegenerativa son muy complejas y tienen como característica el carácter progresivo de los síntomas y la degeneración paulatina de una parte o partes del sistema nervioso que desemboca en una incapacidad física como lo es la actividad motora, y psíquica (Lucas & Ortega, 2009). En el caso de los grupos DMI, se presentó la misma situación que en los grupos Ctrl, ya que las ratas lesionadas con QUIN presentaron un mayor tiempo de reposo y una menor cantidad de movimientos ambulatorios, así como una menor distancia recorrida.

La comparación de los grupos Ctrl contra los grupos DMI mostraron otros resultados. Los grupos lesionados con QUIN no presentan una diferencia significativa con respecto al tiempo de reposo y los movimientos ambulatorios entre los grupos Ctrl y DMI. En cuanto a la distancia recorrida hubo una diferencia muy marcada entre estos grupos, pues el grupo DMI + QUIN presentó una mayor distancia con respecto al grupo Ctrl + QUIN. En el caso de los grupos que fueron lesionados con S.S, presentaron los mismos resultados, ya que no hubo una diferencia significativa en sus tiempos de reposo así como en sus movimientos ambulatorios, mientras que el grupo DMI + S.S presentó una mayor distancia recorrida comparado con el grupo Ctrl + S.S. Sin embargo, al tener un error estadístico bastante amplio en los grupos de DMI no podemos especular que un estado diabético tiene efectos protectores en la actividad motriz, se debería realizar una prueba más amplia así como utilizar un grupo experimental más grande para poder obtener resultados más confiables.

#### 7.4 Evaluación conductual en un modelo de excitotoxicidad inducido por QUIN

Este modelo de estudio se usa generalmente para el estudio de los mecanismos de daño provocados por la enfermedad de Huntington, sin embargo también es un buen modelo de estudio que revela el daño a los receptores a NMDA, tanto *in vitro* como *in vivo* (Santamaría & Jiménez, 2005).



**Figura 9.** Conducta rotatoria. Los datos expresan la media  $\pm$  error estándar, ANOVA seguida de Tukey. \* Diferencia significativa con los grupos S.S, t Diferencia significativa con respecto al grupo Ctrl + QUIN; n= 6 por grupo.  $p < 0.05$ .

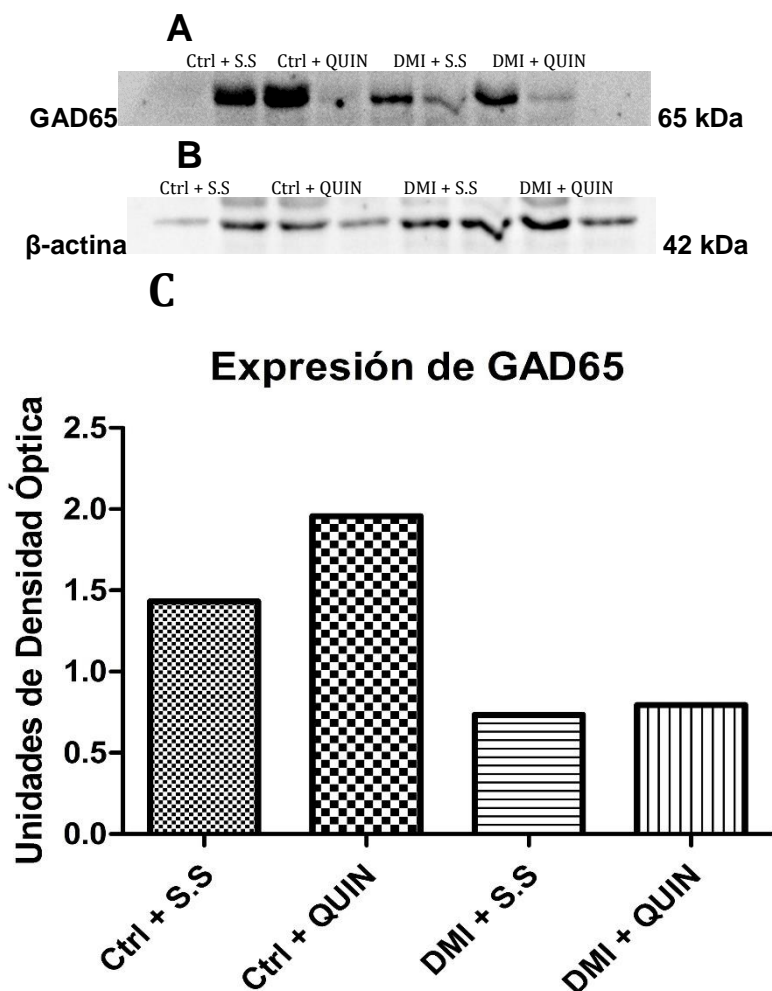
La caracterización del papel neurotóxico de QUIN ha indicado que su administración estriatal está relacionada con el agotamiento de GABA y una mayor peroxidación lipídica (LP). Estas alteraciones bioquímicas también se han relacionado con el desarrollo del comportamiento de giros ipsilaterales en ratas con discapacidad, que se muestran después de un desafío con apomorfina, como se observa en la figura 9, los grupos experimentales que fueron lesionados con QUIN fueron los únicos en presentar los giros ipsilaterales después de haber sido administrados por la apomorfina, esto se debe probablemente a la competencia que se genera entre el QUIN y la apomorfina, al haber un estado previo de excitotoxicidad generado por el QUIN se presenta una despolarización de la membrana que favorece la activación de los receptores a NMDA induciendo la entrada de  $Ca^{2+}$  (excitotoxicidad secundaria) perpetuando así el daño y conduciendo a la muerte neuronal (Fuentes, et al., 2013). La Apomorfina al actuar sobre los receptores dopaminérgicos D2 inhibe la formación de AMPc, activando los canales de  $K^+$  y reduce la entrada de iones de  $Ca^{2+}$  (Bahena, Flores & Arias, 2000). Esto se explica ya que las ratas con lesiones unilaterales tienen un desequilibrio hemisférico en función de la dopamina. En consecuencia, la administración sistémica de un agonista del receptor de dopamina, como la apomorfina, hace que estos animales giren hacia el lado de la lesión estriatal. La velocidad de estas rotaciones es aproximadamente proporcional al tamaño de la lesión y, por lo tanto, proporciona una medida cuantitativa útil de la neurodegeneración del estriado excitotóxico (Schwarcz, et al., 2010).

Los grupos experimentales lesionados con QUIN tuvieron una diferencia significativa entre sí, mientras que el grupo DMI + QUIN presentó un número menor de giros ipsilaterales con respecto al Ctrl + QUIN, al existir una deficiencia de insulina en sangre así como una activación de los receptores a NMDA que disminuyen la

secreción de insulina estimulada por glucosa podemos teorizar que en un estado de hiperglucemia existe un menor daño neuronal, el cual es debido a un estado de protección brindado por la diabetes. Donde no se conoce el mecanismo exacto.

### 7.5 Evaluación de la expresión de GAD65

GAD65 es responsable de catalizar la etapa limitante de la velocidad en la producción de GABA, a partir del ácido L-Glutámico. Se localiza en las membranas de las vesículas sinápticas en las terminales nerviosas, en el caso de una mayor demanda de GABA en la neurotransmisión, GAD65 se activará de forma transitoria para ayudar en la producción de GABA. La cuantificación de la expresión de esta proteína se realiza ampliamente para la detección y/o confirmación de DMI y DMII. GAD y GABA están presentes principalmente en las células nerviosas "GABAérgicas" pero, curiosamente, también se detectan en ciertas células y órganos no neurales, como el páncreas (Towns & Pietropaolo, 2011).



**Figura 10.** Expresión de GAD65 en el estriado de ratas Wistar machos, A) Western blot representativo de GAD 65. B) Western blot representativo de  $\beta$ -actina. C) Gráfica representativa en la comparación de los grupos experimentales con respecto a un análisis de densitometría de la expresión de GAD65,  $n= 2-3$  por grupo, normalizados con respecto a  $\beta$ -actina.

Las proteínas GAD exhiben una regulación traduccional diferente a la proinsulina y a otros autoantígenos de los gránulos secretores de insulina. La exposición a mediano y largo plazo de los islotes aislados a la glucosa, puede aumentar

transcripcionalmente la síntesis de GAD65 por encima del nivel general de síntesis de proteínas en las células. Sin embargo, todavía hay áreas en necesidad de esclarecimiento en cuestión a los efectos fisiológicos de GAD65. Un ejemplo clave es que a pesar de la importancia en las localizaciones tisulares de GAD y la relevancia de la ruta sintética que modula, la investigación en modelos animales ha arrojado resultados desconcertantes, como con el modelo nulo de ratón GAD, en el que las funciones de las células de los islotes parecen estar deteriorados (Townsend & Pietropaolo, 2011). En los modelos experimentales se observa una mayor expresión de GAD65 en los grupos Ctrl, en especial con el grupo Ctrl + QUIN pues al existir un estado previo de excitotoxicidad se presentó un daño neuronal, ya que en condiciones normales cuando existe un periodo de quietud en el sistema GABA se presenta un estado de excitabilidad en los receptores NMDA (Guo, et al., 1997), sin embargo, al presentarse un daño sobre estos receptores la expresión se puede ver modificada. En los grupos DMI se observó una expresión inclusive menor, ya que al existir niveles altos de glucosa en la sangre la expresión de GAD65 no se vio favorecida.

## **8. Conclusiones**

- El modelo de estudio de DMI fue el esperado, pues se presentaron los signos como la sintomatología de experimentos previos en el laboratorio. Por lo que la estandarización de este modelo es la apropiada.
- Las ratas lesionadas con QUIN, así como las ratas diabéticas presentan una disminución en su coordinación motora, debido a un daño neurodegenerativo por parte de la lesión estriatal con QUIN y al impacto negativo que se presenta en la DMI que llegó a afectar su coordinación y actividad motora.
- El impacto negativo que se presenta en la coordinación y actividad motora de las ratas diabéticas se ve reflejado en su actividad y reacción espontánea, sin embargo, no muestran una diferencia significativa con respecto a los grupos Ctrl, así como en las ratas lesionadas con QUIN.
- La cuantificación de los giros ipsilaterales nos da una medida útil de la neurodegeneración del estriado lesionado con QUIN, sin embargo, el grupo DMI + QUIN podría no presentar un estado de excitotoxicidad tan marcado debido a la ausencia de insulina y por la competencia entre QUIN y la apomorfina.
- Las ratas expuestas a un estado de excitotoxicidad presentan una mayor expresión de la proteína GAD65 al estimular los receptores a NMDA, mientras que las ratas que tienen un estado diabético no presentan una buena expresión de esta proteína, ya que al existir una deficiencia de glucosa en su ruta sintética la expresión de la proteína no se ve favorecida.

## 9. Referencias

- Bahena-Trujillo, R., Flores, G., & Arias-Montaño, J. A. (2000). Dopamina: Síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Revista Biomédica*, 39-60.
- Barrio, R. (2004). Diabetes mellitus en la edad pediátrica: diabetes tipo 1, diabetes tipo 2 y MODY. *Endocrinología y Nutrición*, 1-47.
- Bean, L., Zheng, H., Patel, K. P., & Monaghan, D. T. (2006). Variaciones regionales en la regulación negativa del receptor de NMDA en el cerebro de rata diabético con estreptozotocina. *Brain Research*, 217-222.
- Benzadón, M., Forti, L., & Sinay, I. (2014). Actualización en el diagnóstico de la diabetes. *Medicina (Buenos Aires)*, 64-68.
- Bequer, L., Gómez, T., Molina, J. L., Artilles, D., Bermúdez, R., & Clapés, S. (2016). Acción de la estreptozotocina en un modelo experimental de inducción neonatal de la diabetes. *Biomédica*, 230-238.
- Biessels, G., & Gispen, W. (2005). El impacto de la diabetes en la cognición, ¿qué se puede aprender de los modelos de roedores?. *Neurobiol Aging*, 36-41.
- Bruehl, H., Wolf, O., Sweat, V., Tirsi, A., Richardson, S., & Convit, A. (2014). Modificadores de la función cognitiva y la estructura cerebral en personas de mediana y tercera edad con diabetes mellitus tipo 2. *Brain Res*, 186-194.
- Chen S, Willis J, Maclean C, Ananieva-Jordanova R, Amoroso MA, Brooking H, Powell M, Collins A, Bennett S, Mitchell S, Burne P, Furmaniak J, Smith BR (2005). Ensayos no isotópicos sensibles para autoanticuerpos contra IA-2 y una combinación de IA-2 y GAD65. *Clin Chim Acta*.357 (1): 74-83.
- Iubus Instrument. (15 de Octubre de 2018). *Medidor de actividad animal; Opto-Varimex-5-Auto-Track*. Obtenido de Columbus Instrument: <http://www.colinst.com/products/animal-activity-meter-opto-varimex-auto-track>
- Fuentes-Bello, A. C., Pérez-Carrera, D., Pérez-de la Cruz, V., Santamaría-del Ángel, A., & Carrillo-Mora, P. (2013). Efectos a largo plazo de la coadministración subtóxica de ácido 3-nitropropiónico y ácido quinolínico en el estriado de rata. *Investigación en Discapacidad*, 3-11.
- Gold, S., Dziobek, I., Sweat, V., Tirsi, A., Rogers, K., Bruehl, H., . . . Convit, A. (2007). Daño en el hipocampo y deterioro de la memoria como posibles complicaciones cerebrales tempranas de la diabetes tipo 2. *Diabetologia*, 711-719.
- Guo, Y., Kaplan, I. V., Cooper, N., & Mower, G. (1997). Expresión de dos formas de ácido glutámico descarboxilasa (GAD67 y GAD65) durante el desarrollo postnatal de la corteza visual del gato. *Developmental Research Brain*, 127-141.
- Hernández Avila, M., Pablo Gutiérrez, J., & Reynoso Noverón, N. (2013). Diabetes mellitus en México. El estado de la epidemia. *Salud pública de México*, S129-S136.
- Hernández Romieu, A. C., Elnecavé Olaiz, A., Huerta Uribe, N., & Reynoso Noverón, N. (2011). Análisis de una encuesta poblacional para determinar los factores asociados al control de la diabetes mellitus en México. *Salud pública de México*, 34-39.
- Heyes MP, Saito K, Crowley JS, Davis LE, Demitrack MA, Der M. (1992). Metabolismo de la vía de la quinurenina y del ácido quinolínico en enfermedades neurológicas inflamatorias y no inflamatorias. *Brain*; 115: 1249-73

- Huidobro Pérez, D., & Picazo, O. (2005). Comparación del efecto neuroprotector del 17 beta-estradiol y el 17 alfa-etinil estradiol en el hipocampo de la rata. [Tesis de Maestría] Ciudad de México, México: Instituto Politécnico Nacional.
- IBL, I. (2011). Enzimoimmunoensayo para la detección cualitativa y cuantitativa de anticuerpos contra GAD65 humana en el suero humano. Hamburgo, Alemania: IBL International GMBH.
- International Diabetes Federation. (2015). *IDF Atlas de la Diabetes 7° edición 2015*. Obtenido de IDF Diabetes Atlas Seventh Edition 2015: <http://www.idf.org/diabetesatlas/5e/es/que-es-la-diabetes>
- International Diabetes Federation. (2015). *Federación Internacional de la Diabetes. Obtenido de Complicaciones de la diabetes*: <http://www.idf.org/node/26454?language=es>
- Jiménez Maldonado, M. E. (2016). Sustratos neurales de la fluencia y alternancia en sujetos con diabetes mellitus tipo 1 (DM-1) a partir de respuesta BOLD de Resonancia Magnética funcional. Obtenido de Biblioteca CUCBA Udeg: <http://repositorio.cucba.udg.mx:8080/xmlui/handle/123456789/5142>
- López-Martínez, M., & Salgado-Zamora, H. J. (2010). Estudio de la actividad ansiolítica y/o sedante potencial de derivados de Imidazo[1,2- $\alpha$ ]piridina. [Tesis Doctoral]. Ciudad de México, México: Instituto Politécnico Nacional.
- Lucas, J. J., & Ortega, Z. (2009). Modelos animales de enfermedades neurodegenerativas: ejemplo de la enfermedad de Huntington. *Monografía XXV: Avances en Neurociencia: Neurotransmisores y Patologías Nerviosas*, 237-272.
- Magariños, A. M., & McEwen, B. S. (2000). Experimental diabetes in rats causes hippocampal dendritic and synaptic reorganization and increased glucocorticoid reactivity to stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 11056-11061.
- Martínez Chamorro, M. J., Lastra Martínez, I., & C, L. T. (2002). Perfil psicosocial de niños y adolescentes con diabetes mellitus. *Boletín de la sociedad de pediatría de austrias*, 114-119.
- McNay, E., Ong, C., McCrimmon, R., Cresswell, J., Bogan, J., & Sherwin, R. (2010). Los procesos de memoria del hipocampo están modulados por la insulina y la resistencia a la insulina inducida por alto contenido de grasa. *Neurobiology of Learning and Memory*, 546-553.
- Méndez M, Méndez-López M, López L, Aller MA, Arias J, Cimadevilla JM, Arias JL.(2008) Alteraciones de la memoria espacial en tres modelos de encefalopatía hepática. *Behavioural Brain Research*. 188(1):32-40.
- Pérez-De la Cruz V, Carrillo-Mora P, Santamaría A. (2010). Enfermedad de Huntington y alteraciones mitocondriales: énfasis en modelos experimentales. *J Bioenerg Biomembr*; 42: 207-215.
- Pérez-De la Cruz V, Carrillo-Mora P, Santamaría A. (2012). El ácido quinolínico, una molécula endógena que combina la excitotoxicidad, el estrés oxidativo y otros mecanismos tóxicos. *International Journal Tryptophan Research*; 5: 1-8.
- Pérez-Severiano, F., Escalante, B., & Ríos, C. (1998). La inhibición de la sintasa de óxido nítrico previene la neurotoxicidad aguda del estriado inducida por quinolinato. *Neurochemical Research*, 1297-1302.

- Plascencia Nieto, E., & López Sánchez, P. (2006). Regulación de la COX-2 por el NaCl en la Macula Densa durante la Diabetes Mellitus inducida en ratas. [Tesis de Maestría]. Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México.
- Potter MC. (2010). La reducción de la formación de ácido kinurénico endógeno mejora el glutamato extracelular, la plasticidad del hipocampo y el comportamiento cognitivo. *Neuropsychopharmacology*; 35: 1734-1742.
- Rees, D. A., & Alcolado, J. C. (2005). Modelos animales de Diabetes Mellitus. *Department of -Medicine, University of Wales*, 359-370.
- Santamaría A, Jiménez ME. (2005). El estrés oxidativo/nitroso, un factor común en diferentes paradigmas neurotóxicos: una visión general. *Curr Top Neurochem*; 4: 1-6.
- Sampedro-Piquero P, Zancada-Menéndez C, Begega A, Méndez M, Arias JL. (2013). Efectos del ejercicio forzado sobre la memoria espacial y la actividad de la Citocromo C oxidasa en ratas de edad avanzada. *Brain Research*. 1502:20-9.
- Schwarcz R, Bruno JP, Muchowski PJ, Wu HQ. (2012). Quinureninas en el cerebro de los mamíferos: cuando la fisiología se encuentra con la patología. *National Review Neuroscience*; 13: 465-477.
- Schwarcz, R., Guidetti, P., Sathyaikumar, K., & Muchowski, P. (2010). De ratones, ratas y hombres: Revisando la hipótesis del ácido quinolínico de la enfermedad de Huntington. *Prog. Neurobiol.*, 230-245.
- Szamosközi, S., & Kinga, K. (2014). Impacto de la diabetes, la duración de la diabetes y el control glucémico sobre las funciones cognitivas. Un metanálisis cuantitativo. *Procedia-Social and Behavioral Sciences*, 544-548.
- Törn C, Mueller PW, Schlosser M, Bonifacio E, Bingley PJ; Participating Laboratories (2008). Programa de estandarización de anticuerpos contra la diabetes: Evaluación de ensayos de autoanticuerpos contra la descarboxilasa del ácido amónico y el antígeno-2 de los islotes. *Diabetologia* 51 (5): 846-852
- Towns, R., & Pietropaolo, M. (2011). Los autoanticuerpos GAD65 y su papel como biomarcador de la diabetes tipo 1 y la Diabetes Autoinmune Latente en Adultos (LADA). *Drugs Future*, 847.

---

Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda  
 Profesor Investigador de UAM-X  
 Jefe del Departamento de Neuroquímica  
 No. Económico: 16190

---

Dra. Francisca Pérez Severiano  
 Investigadora en Ciencias Médicas "E"  
 Departamento de Neuroquímica  
 No. de Cédula Profesional: 193192