



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escuela Técnica Superior
de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

Universitat Politècnica de València

Escuela Técnica Superior de Ingeniería

Agronómica y del Medio Natural

Grado en Biotecnología

Expresión de IRS2 en ratones afectados con ataxia de Friedreich

Trabajo Final de Grado

Autor: Borja Gil Carceller

Año académico 2018/2019

Valencia, Julio 2019

Tutora: Amparo Galán Albiñana

Tutora UPV: Lynne Paula Yenush



Título: Expresión de IRS2 en ratones afectados con ataxia de Friedreich

Lugar de realización: Centro de Investigación Príncipe Felipe

Fecha: Julio de 2019

Localidad: Valencia

Titulación: Grado en Biotecnología

Alumno: Borja Gil Carceller

Tutora: Amparo Galán Albiñana

Tutora UPV: Lynne Paula Yenush

Resumen:

La ataxia de Friedreich (FRDA) es una enfermedad neurodegenerativa causada por una expansión en el trinucleótido GAA del primer intrón del gen *FXN* que codifica la frataxina, una proteína mitocondrial, lo que deriva en una disminución de la transcripción del mRNA y los niveles de frataxina en los tejidos. La FRDA se ha relacionado con una disminución de la actividad mitocondrial debido al incremento de especies reactivas de oxígeno y una disminución de la producción de ATP. Se ha observado que un porcentaje de pacientes con FRDA desarrolla diabetes de tipo 2 con el transcurso de la enfermedad. Esto es debido a defectos en las células β del páncreas que deriva en su deficiencia y en la consecuente reducción de la producción de insulina que, junto con la resistencia a insulina, son factores desencadenantes de la diabetes tipo 2. Por otro lado, en los procesos de diabetes tipo 2 y resistencia a insulina también están envueltos los sustratos receptores de insulina (IRS) tipo 1 y 2 de los cuales, la disfunción de IRS2 contribuye a la fisiopatología de la diabetes tipo 2. Es por esto por lo que en los tejidos afectados con FRDA puede existir una menor expresión de IRS2 que, junto con una disminución de producción de insulina, puede contribuir a un mayor riesgo de padecer diabetes tipo 2 en pacientes afectados por FRDA. En definitiva, se ha realizado un análisis genético mediante RT-PCR y PCR cuantitativa de los componentes principales de la vía de señalización de la insulina (*Irs1*, *Irs2*, *Igf1*, *InsR*, *Igf1R*) en distintos tejidos (cerebro, cerebelo, músculo, hígado y páncreas) de ratones afectados con FRDA, para estudiar la relación entre la FRDA y la alteración de la vía de la insulina que deriva a estados diabéticos. También se añadió al estudio genético el gen mitocondrial *Ucp2* debido a su implicación en procesos de diabetes tipo 2 y FRDA. Los resultados mostraron una relación entre la FRDA y la vía de la insulina en algunos de los tejidos estudiados.

Palabras clave: Ataxia de Friedreich; diabetes tipo 2; IRS2, señalización de insulina

Title: Expression of IRS2 in mice affected with Friedreich's ataxia

Abstract:

Friedreich's ataxia (FRDA) is a neurodegenerative disease caused by an expansion in the GAA trinucleotide of the first intron of the FXN gene encoding frataxin, a mitochondrial protein, resulting in a decrease in mRNA transcription and frataxin levels in tissues. FRDA has been associated with a decrease in mitochondrial activity due to an increase in reactive oxygen species and a decrease in ATP production. It has been observed that a percentage of patients with FRDA may develop diabetes over the course of the disease. This is due to defects in the cells of the pancreas β which leads to their deficiency and the consequent reduction of insulin production which, together with insulin resistance, are triggering factors of type 2 diabetes. The processes of type 2 diabetes and insulin resistance also involve insulin receptor substrates (IRS) type 1 and 2 of which IRS2 dysfunction contributes to the pathophysiology of type 2 diabetes. Therefore, in tissues affected by FRDA there may be a lower expression of IRS2 which, together with the above, may contribute to an increased risk of type 2 diabetes in patients affected by FRDA. In short, a genetic analysis using RT-PCR and quantitative PCR of the main components of the insulin signaling pathway (*Irs1*, *Irs2*, *Igf1*, *InsR*, *Igf1R*) in different tissues (brain, cerebellum, muscle, liver and pancreas) of mice affected with FRDA has been carried out in order to study the relationship between FRDA and the alteration of the insulin pathway that leads to diabetic states. Finally, the mitochondrial *Ucp2* gene was also added to the genetic study due to its potential involvement in diabetes processes and mitochondrial affectation in FRDA pathogenesis. The results showed a relationship between FRDA and the insulin pathway in some of the tissues studied.

Key words: Friedreich's ataxia; type 2 diabetes; IRS2, insulin signaling

Agradecimientos

En primer lugar, agradecer a todo el I-23 por haberme acogido durante esta estancia y brindarme esta oportunidad, en especial a Amparo por haberse ofrecido a tutorizarme y por su dedicación, sin ti esto no podría haber sido posible.

A mi familia, un apoyo incondicional. En especial a mi abuela, a mi madre y a mi tía ya que sin ellas no habría llegado tan lejos.

A mis amigos, a todos ellos, por ser mi segunda familia.

TABLA DE CONTENIDOS

Resumen:	I
Abstract	II
Agradecimientos	III
TABLAS Y FIGURAS	VI
ABREVIATURAS	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ATAXIA DE FRIEDREICH	1
1.1.1. Definición y patogenia de la enfermedad	1
1.1.2. Genética, función y déficit de la frataxina	1
1.1.3. Relación de la diabetes tipo 2 con la ataxia de Friedreich	2
1.2. SEÑALIZACIÓN DE INSULINA.....	3
1.2.1. Insulina e IGF-1	3
1.2.2. Receptor de insulina y receptor de IGF-1	3
1.2.3. Proteínas IRS.....	5
1.2.4. Ruta de señalización de insulina e IGF-1	5
1.3. DIABETES TIPO 2.....	8
1.3.1. Diabetes tipo 2 y resistencia a la insulina.....	8
1.3.2. Diabetes tipo 2 y deficiencia de proteínas IRS.....	8
1.3.3. Diabetes y UCP2.....	9
2. OBJETIVOS	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	11
3.2. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE RNA TOTAL.....	13
3.3. RETROTRANSCRIPCIÓN DEL RNA	14
3.4. CUANTIFICACIÓN DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS	14
3.5. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN TRANSCRIPCIONAL POR PCR CUANTITATIVA	14
3.6. ANÁLISIS DE LOS DATOS OBTENIDOS MEDIANTE PCR CUANTITATIVA	16
4. RESULTADOS	17
4.1. ELECCIÓN DE UN GEN <i>HOUSEKEEPING</i> ADECUADO PARA EL ESTUDIO... ..	17

4.2. SEÑALIZACIÓN DE INSULINA. EXPRESIÓN DE <i>Irs1</i>, <i>Irs2</i>, <i>Igf-1</i>, <i>InsR</i> e <i>Igf1R</i>	19
4.2.1. Cerebro.....	19
4.2.2. Cerebelo	20
4.2.3. Músculo	21
4.2.4. Hígado	22
4.2.5. Páncreas	23
4.3. EXPRESIÓN DE UCP2.....	25
5. DISCUSIÓN.....	26
6. CONCLUSIONES.....	29
7. BIBLIOGRAFÍA	30

TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Ratones control e YG8R empleados	11
Tabla 2. Tejidos empleados en el estudio.....	12
Tabla 3. Condiciones para la retrotranscripción	14
Tabla 4. Cebadores empleados en la PCR a tiempo real	15
Tabla 5. Condiciones para la amplificación de los genes por PCR cuantitativa	16
Tabla 6. Valores de R ² en la correlación de <i>Hprt</i>	18
Tabla 7. Valores de R ² en la correlación de <i>18s</i>	18
Tabla 8. Expresión de <i>Irs1</i> , <i>Irs2</i> , <i>InsR</i> , <i>Igf1</i> e <i>Igf1R</i> en tejidos de ratones afectados con FRDA.....	25
Figura 1. Receptor de insulina e IGF-1.....	4
Figura 2: Ruta de señalización de la insulina e IGF-1.	7
Figura 3. Unicidad y calidad de cada amplicón	16
Figura 4. Correlación de los valores de Cp del gen <i>Hprt</i> y <i>18s</i> entre dos placas de PCR cuantitativa	17
Figura 5. Representación gráfica de la expresión génica de <i>Irs1</i> , <i>Irs2</i> , <i>InsR</i> , <i>Igf1</i> e <i>Igf1R</i> en cerebro. Se muestra la expresión de dichos genes	19
Figura 6. Representación gráfica de la expresión génica de <i>Irs1</i> , <i>Irs2</i> , <i>InsR</i> , <i>Igf1</i> e <i>Igf1R</i> en cerebelo	20
Figura 7. Representación gráfica de la expresión génica de <i>Irs1</i> , <i>Irs2</i> , <i>InsR</i> , <i>Igf1</i> e <i>Igf1R</i> en músculo	21
Figura 8. Representación gráfica de la expresión génica de <i>Irs1</i> , <i>Irs2</i> , <i>InsR</i> , <i>Igf1</i> e <i>Igf1R</i> en hígado.....	22
Figura 9. Representación gráfica de la expresión génica de <i>Irs1</i> , <i>Irs2</i> , <i>InsR</i> , <i>Igf1</i> e <i>Igf1R</i> en páncreas	23
Figura 10. Representación gráfica de la expresión génica de UCP2 en los distintos tejidos....	25
Figura 11. Expresión de IR, IRS-1, IGF1R e IRS-2 en cerebro y cerebelo de ratón	27
Figura 12. Modelo propuesto de expresión génica	28

ABREVIATURAS

AKT: Proteína quinasa serina-treonina

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario

FRDA: Ataxia de Friedreich

GSK3: Glucógeno sintasa quinasa 3

HPRT: Hipoxantina fosforibosiltransferasa

IGF-1: Factor de crecimiento insulínico 1

IGF-1R: Receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1

IR/InsR: Receptor de insulina

IRS2: Sustrato receptor de insulina 2

KLRB: Quinasa regulatoria del bucle de enlace (Kinase Regulatory Loop Binding)

PH: Dominio con homología a la Pleckstrina

PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinasa

PIP₃: Fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfato

PTB: Unión de fosfotirosina

RNA: Ácido ribonucleico

T2DM: Diabetes mellitus tipo 2

UCP2: Proteína de desacoplamiento (Uncoupling Protein) 2

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ATAXIA DE FRIEDREICH

1.1.1. Definición y patogenia de la enfermedad

Nikolaus Friedreich describió entre 1863 y 1877 una nueva enfermedad que se conoce actualmente como ataxia de Friedreich (FRDA; OMIM #229300; ORPHA95). La ataxia de Friedreich (FRDA, por sus siglas en inglés) se trata de una enfermedad neurodegenerativa autosómica recesiva con afectación a las vías propioceptivas del sistema nervioso periférico, la médula espinal y al núcleo dentado del cerebelo en el sistema nervioso central. Es una enfermedad lentamente progresiva cuya edad media de comienzo es durante la adolescencia, generalmente antes de los 25 años, sobre los 10.52 ± 7.4 años (Harding, 1981) mientras que el inicio tardío de la enfermedad es sobre los 24,4 años (De Michele *et al.*, 1989). La duración media de la enfermedad es de 11 ± 6.8 años y la edad media de muerte es sobre los 37.54 ± 14.35 años.

La patología de la enfermedad se caracteriza a grandes rasgos por la pérdida de los axones mielinizados de las neuronas sensitivas grandes. A estos cambios les siguen la pérdida de las fibras mielínicas de los nervios periféricos encargados de la sensibilidad profunda en la médula espinal, especialmente en la zona lumbar, lo que provoca debilidad muscular en las extremidades inferiores y, posteriormente aparece disartria y escoliosis (Koeppen, 2011). El proceso neurodegenerativo conlleva a la invalidez condenando al paciente a una silla de ruedas a los 15 años de los primeros síntomas de la enfermedad. Además, los pacientes también padecen diversas miocardiopatías derivadas de la enfermedad lo que, en la mayoría de los casos, es la causa de muerte más típica (Bürk, 2017).

1.1.2. Genética, función y déficit de la frataxina

La ataxia de Friedreich se trata de la ataxia hereditaria más común de todas. En cuanto a la epidemiología, la prevalencia de la FRDA oscila entre 1:20.000 y 1:725.000 en las poblaciones occidentales y 4,7 casos por 100.000 habitantes en la población española (Vankan, 2013; Polo *et al.*, 1991). La enfermedad se hereda a través de un patrón autosómico recesivo, siendo responsable el gen de *FXN*, localizado en el cromosoma 9q13, que codifica una proteína de 210 aminoácidos llamada frataxina, que se encuentra asociada a la membrana interna mitocondrial. La FRDA está asociada con una mutación que consiste en la expansión de la repetición del trinucleótido GAA (guanina-adenina-adenina) en el primer intrón del gen de la frataxina. El tamaño de la expansión de GAA corresponde a un número variable entre 120 y 1.700 repeticiones, mientras que el gen normal de la frataxina tiene entre 8 y 22 repeticiones de GAA (Dürr *et al.*, 1996). La consecuencia de las expansiones de las repeticiones de GAA es la inhibición de la expresión del gen de *FXN* debido a cambios epigenéticos en el intrón 1 de dicho gen, que provoca una disminución de la transcripción del mRNA y, por tanto, de los niveles de proteína frataxina en todos los tejidos (Polo *et al.*, 1991; Campuzano *et al.*, 1996).

La expansión de GAA conlleva a la reducción de los niveles de expresión de la proteína frataxina lo que se traduce en la principal causa de la FRDA. En cuanto a la frataxina, se trata de una pequeña proteína asociada a la membrana interna mitocondrial que presenta tres isoformas FXNI, FXNII y FXNIII, siendo la isoforma FXNI la más abundante y a la que se le atribuyen todas las funciones mitocondriales. Se encuentra en las células de todo el cuerpo, pero los niveles más altos se encuentran en el corazón, la médula espinal, el cerebelo, el hígado, el páncreas y el músculo esquelético (González-Cabo y Palau, 2013).

La frataxina participa en diversos procesos celulares como la homeostasis del hierro celular, en procesos celulares de respuesta al estrés oxidativo, activación de la aconitasa y producción energética de la célula (Pandolfo, 2008). Una de sus funciones más reconocidas es que actúa como una chaperona de hierro mitocondrial, participando en la biosíntesis de centros Fe-S (ISC) y de grupos hemo participando así en la homeostasis celular del hierro (Adinolfi *et al.* 2009; Schmucker *et al.* 2011).

La deficiencia de la frataxina conduce a una alteración de la homeostasis del hierro y a la consecuente acumulación de hierro en las mitocondrias lo que resulta en su disfunción. Por tanto, hay una reducción de la formación de ATP y se generan sustancias reactivas de oxígeno (ROS). Como se ha comentado anteriormente, la frataxina participa en el ensamblaje de los centros Fe-S (ISC) presentes en los complejos I, II Y III de la cadena de transporte de electrones (CTE) y en la aconitasa (enzima que actúa en el ciclo de Krebs). Por tanto, la deficiencia de frataxina provoca un deterioro de estas enzimas lo que conlleva a una función anormal de la CTE y, por consiguiente, la generación de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (González-Cabo y Palau, 2013; Rötig *et al.*, 1997; Marmolino, 2011). Estas especies reactivas de oxígeno aparecen debido a un aumento del hierro en el interior de la matriz mitocondrial y por la fuga de electrones de la CTE (Marmolino, 2011; Pandolfo y Pastore, 2009).

Todo esto afecta gravemente a la mitocondria que resulta en su disfunción y, además conlleva a un estado de estrés oxidativo celular, lo que puede provocar la muerte celular por apoptosis. Por último, el déficit de frataxina provoca la alteración de procesos celulares como la dinámica mitocondrial, la homeostasis de calcio y afecciones en el citoesqueleto.

1.1.3. Relación de la diabetes tipo 2 con la ataxia de Friedreich

En algunos estudios, se ha determinado que la incidencia de la diabetes está relacionada con el tamaño de la expansión del trinucleótido GAA en el gen de la frataxina (Filla *et al.*, 1996; Delatycki *et al.* 1999), mientras que en otros no se ha encontrado ninguna correlación (Durr *et al.* 1996; Montermini *et al.*, 1997). Los pacientes con FRDA pueden desarrollar una hiperglicemia característica de diabetes con el paso del tiempo de la enfermedad, no se trata de un síntoma característico de la ataxia, sino que debuta en estadios prolongados de la enfermedad (Harding 1981; De Michele *et al.* 1996).

La diabetes está causada por defectos en la secreción de insulina por parte de las células β pancreáticas y por un fallo de la acción de la insulina en tejidos diana (resistencia a insulina). La pérdida de la tolerancia a la glucosa en pacientes con FRDA es debido esencialmente a la disfunción de las células β pancreáticas ya que se ha observado una reducción de la masa de islotes de células β en páncreas de individuos afectados con FRDA. Además, la resistencia a insulina está presente de manera frecuente en la FRDA que, junto con la disfunción de las células β lleva al desarrollo de diabetes (Cnop *et al.*, 2012; 2013).

La reducción del número de islotes de células β pancreáticas es debido principalmente al fallo mitocondrial que ocurre en la FRDA. Las mitocondrias en las células β son responsables de aportar la energía necesaria para responder a los requerimientos celulares. Básicamente, la mitocondria genera ATP para estimular la exocitosis de insulina. Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, durante la FRDA se produce una disfunción de las mitocondrias y un incremento de ROS, lo que afecta gravemente a las células β , llevándolas a su disfunción (Cnop *et al.*, 2012; González-Cabo y Palau, 2013). Además, también se ha visto que las células β deficientes en frataxina presentan estrés del retículo endoplasmático, que contribuye a la disfunción de las células β y consecuentemente afecta a la secreción de insulina e induce resistencia a la insulina (Eizirik *et al.*, 2008).

1.2. SEÑALIZACIÓN DE INSULINA

1.2.1. Insulina e IGF-1

La insulina es una hormona peptídica de 51 aminoácidos que es sintetizada por las células β de los islotes de Langherhans del páncreas endocrino. A nivel metabólico, los principales órganos diana de la insulina son principalmente el hígado, el músculo y el tejido adiposo. La función principal de la insulina es mantener los niveles normales de glucosa en sangre, al facilitar la captación de glucosa por parte de las células, regular el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas y promover la división y el crecimiento celular (Wilcox, 2005). La síntesis y liberación de insulina se produce cuando aumentan los niveles de glucosa en la sangre, generalmente después de la ingesta de alimentos (Nussey y Whitehead, 2001).

El factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1) es una hormona peptídica de 70 aminoácidos codificada por el gen *Igf-1*. La mayor parte del IGF-1 circulante es generado por el hígado, pero también por otros tejidos como el intestino, músculo, huesos, cerebro y gónadas. Actúa tanto de forma endocrina como de forma autocrina/paracrina cuando es producido localmente en el tejido. Circula en el plasma formando un complejo con proteínas de unión a IGF o de forma libre (Górecki *et al.*, 2007; Peruzzi *et al.*, 2015)

IGF-1 es sintetizado en respuesta a la estimulación de la hormona de crecimiento hipofisiaria y es el factor responsable de los efectos anabólicos de la hormona de crecimiento por lo que participa en la regulación del crecimiento corporal y de diversos procesos metabólicos. IGF-1 actúa a través del receptor del factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1R) en la ruta de señalización de insulina/IGF-1, participando en funciones antiapoptóticas, de proliferación, diferenciación y supervivencia celular (Ohlsson *et al.*, 2009).

Tanto la insulina como IGF-1 están estrechamente relacionados ya que median sus efectos biológicos a través de sus receptores celulares (IR e IGF-1R respectivamente) los cuales presentan una maquinaria de señalización celular similar y, por tanto, presentan funciones similares (Boucher *et al.*, 2014; Clemmons, 2004).

1.2.2. Receptor de insulina y receptor de IGF-1

Cuando la insulina e IGF-1 llegan hasta una célula diana, media su función sobre ésta uniéndose al receptor de insulina (IR) y al receptor del factor de crecimiento insulínico (IGF-1R), respectivamente. Estos receptores son proteínas tetraméricas tirosina-quinasa altamente relacionadas entre sí, que consisten en dos subunidades extracelulares α (dominio extracelular de unión del ligando) y un dominio citoplasmático formado por dos subunidades transmembrana β donde se encuentra el dominio tirosina-quinasa. Estas subunidades están unidas por puentes disulfuro constituyendo el heterodímero $\alpha_2\beta_2$ (**Figura 1**). Tanto IR como IGF-1R pueden ser activados por insulina y por IGF-1, aunque cada uno presenta mayor afinidad por el suyo propio (Boucher *et al.*, 2014; Schlessinger, 2000).

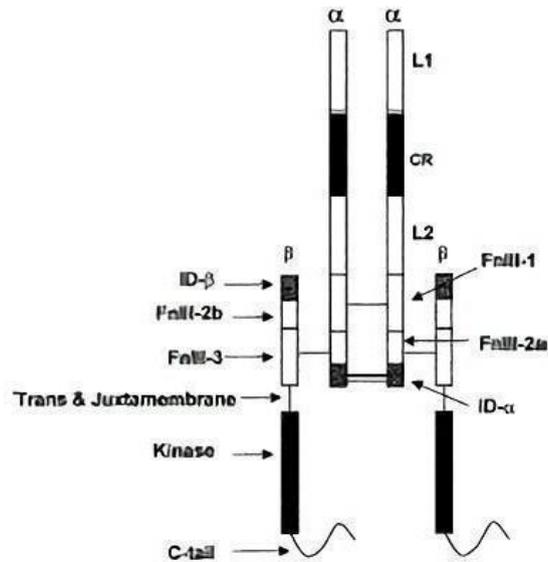


Figura 1. Receptor de insulina e IGF-1. Representación de la estructura del dímero IGF-1R/IR en donde se muestran la distribución de los distintos dominios y las subunidades α y β . En las subunidades α se encuentra el dominio de unión del ligando y en las β el dominio tirosina-quinasa implicado en la transducción de la señal (Ward et al., 2013).

1.2.3. Proteínas IRS

Un nodo fundamental y crítico de la ruta de señalización de la insulina son las proteínas del sustrato receptor de insulina (IRS). Se tratan de una familia de proteínas que está formada por cuatro miembros: IRS1, IRS2, IRS3 e IRS4; de las cuales IRS1 e IRS2 son las más expresadas. Estas proteínas presentan varios dominios en común, por un lado, el dominio PH y, por otro lado, el dominio PTB que interactúa con los residuos de tirosina fosforiladas tanto de IR como de IGF-1R y, por tanto, que están involucrados en la señalización intracelular de la insulina e IGF-1 (White, 2002).

Tanto IRS1 como IRS2 se expresan en todos los tejidos, principalmente en los periféricos, tanto en ratones como en humanos y actúan en la señalización vía IR e IGF-1R como andamios de proteínas para formar complejos de señalización. Ambas tienen una estructura similar, aunque IRS2 posee un dominio adicional, el KRLB el cual interacciona con el dominio tirosina-quinasa del IR lo que limita la fosforilación de IRS2, por lo que es una interacción inhibitoria. Esto puede contribuir a la diferencia entre las funciones de IRS1 e IRS2 ya que, aunque participen en la misma ruta de señalización, los fenotipos *knockout* para estas proteínas son distintos (Shaw, 2011).

Por un lado, los ratones deficientes en IRS1 presentan una acción defectuosa de la insulina en el músculo y una disminución del crecimiento corporal debido a la resistencia a IGF-1 (Araki et al., 1994). Además, IRS-1 *in vivo* tiene un papel más importante que el IRS-2 en la regulación general del metabolismo de los carbohidratos en el músculo y su deficiencia provoca una resistencia a insulina en este tejido, aunque no desarrolla diabetes (Previs et al., 2000). Por otro lado, en los ratones deficientes en IRS2 se produce una gran resistencia a la insulina en el hígado, el músculo esquelético y una disminución de la masa de células β pancreáticas lo que conlleva al desarrollo de diabetes tipo 2 (Withers et al., 1998).

1.2.4. Ruta de señalización de insulina e IGF-1

Cuando una molécula de insulina o IGF-1 se unen a la región extracelular de sus receptores (IR e IGF-1R respectivamente), la subunidad α induce un cambio conformacional en el receptor, lo que atrae las dos subunidades β hacia una posición cercana. Seguidamente, se produce una autofosforilación en la región intracelular por una serie de alteraciones en la subunidad β , que activa al receptor promoviendo su actividad tirosina-quinasa (Belfiore et al., 2009).

Tras la activación del receptor, la quinasa comienza a fosforilar sustratos intracelulares dentro de los que se incluye la familia de proteínas IRS y el adaptador Shc. Estas proteínas contienen dominios SH2 (del inglés *Src Homology 2*) o dominios PTB los cuales tienen la capacidad de reconocer y unirse a los residuos de tirosina fosforilada y después fosforilarse, por lo que contribuyen al punto de partida de las distintas cascadas de señalización que conllevan a la transducción de la señal. Es por esto por lo que el primer nodo crítico de la ruta de señalización de la insulina es la asociación de las proteínas IRS a IR e IGF-1R. Los otros dos nodos críticos de la vía corresponden a PI3K y AKT/PKB (De Meyts, 2000; Taniguchi et al., 2006) (**Figura 2**).

Las dos principales vías de señalización de la insulina son, por un lado, la vía PI3K /AKT y, por otro lado, la vía Ras-MAPK (Belfiore et al., 2009; De Meyts, 2000). Cada una realiza efectos distintos en la célula, por un lado, la vía PI3K es responsable de los efectos metabólicos de la insulina y se activa exclusivamente por las proteínas IRS, mientras que por otro lado la vía MAPK emana tanto de las proteínas IRS como de Shc y controla principalmente el crecimiento y diferenciación celular (Belfiore, et al., 2009; De Meyts, 2000; Taniguchi et al., 2006) (**Figura 2**).

Vía de señalización de PI3K

La activación de la vía de PI3K comienza con la unión de las subunidades p85 o p55 de PI3K a IRS1 e IRS2, lo que conlleva a su fosforilación y a la consecuente activación de la subunidad catalítica p110. La subunidad p110 a PIP₂, un lípido de membrana, generando así su forma fosforilada PIP₃. Seguidamente, PIP₃ recluta hacia la membrana plasmática a PDK1 la cual activa AKT (Shepherd *et al.*, 1998; White, 2003).

Una vez AKT se encuentra fosforilada, interactúa con otros sustratos críticos posteriores como son mTOR (diana de rapamicina en células de mamífero), GSK3, FoxO1 (Forkhead box protein O1) y AS160 (De Meyts, 2000). Por un lado, el nodo AKT activa mTOR que se trata de una proteína serina/treonina quinasa que actúa como estimulador de la síntesis proteica (Düvel *et al.*, 2010). Por otro lado, se bloquea GSK3, una proteína serina/treonina quinasa implicada en la regulación de la síntesis de glucógeno y una variedad de reguladores de la supervivencia celular (Cohen y Frame, 2001). FoxO1 es un factor de transcripción que se transloca al núcleo en ausencia de insulina para activa genes relacionados con la gluconeogénesis, por lo que cuando se activa por AKT es secuestrado en el citoplasma inhibiéndose así la gluconeogénesis (Tzivion *et al.*, 2011). Por último, AS160 es una proteína que al interactuar con AKT participa en la toma de glucosa por parte de la célula (Sano *et al.*, 2003) (**Figura 2**).

Ruta de señalización de Ras-MAPK

La activación de la ruta de Ras-MAPK se produce cuando Grb2, que es un adaptador, se une a IRS y a Shc a través de su dominio SH2 (De Meyts, 2000; Skolnik *et al.*, 1993). Además, Grb2 se une al factor de intercambio de nucleótidos de guanina para ras SOS (del inglés, *Son of Sevenless*). SOS activa a ras, una proteína de unión a GTP con actividad GTPasa que conlleva a la consecuente activación de Raf, que, a su vez, fosforila a la quinasa de especificidad dual MAPK (MEK1), que fosforila a ERK1/2. En su forma inactiva, ERK1/2 se localiza en el citoplasma y cuando se fosforila por MEK1, se traslada al núcleo donde fosforila a una serie de factores de transcripción y proteínas promoviendo la expresión génica. La vía Ras-MAPK participa en el crecimiento, supervivencia y diferenciación celular (Belfiore *et al.*, 2009; Cohen, 2006; Taniguchi *et al.*, 2006) (**Figura 2**).

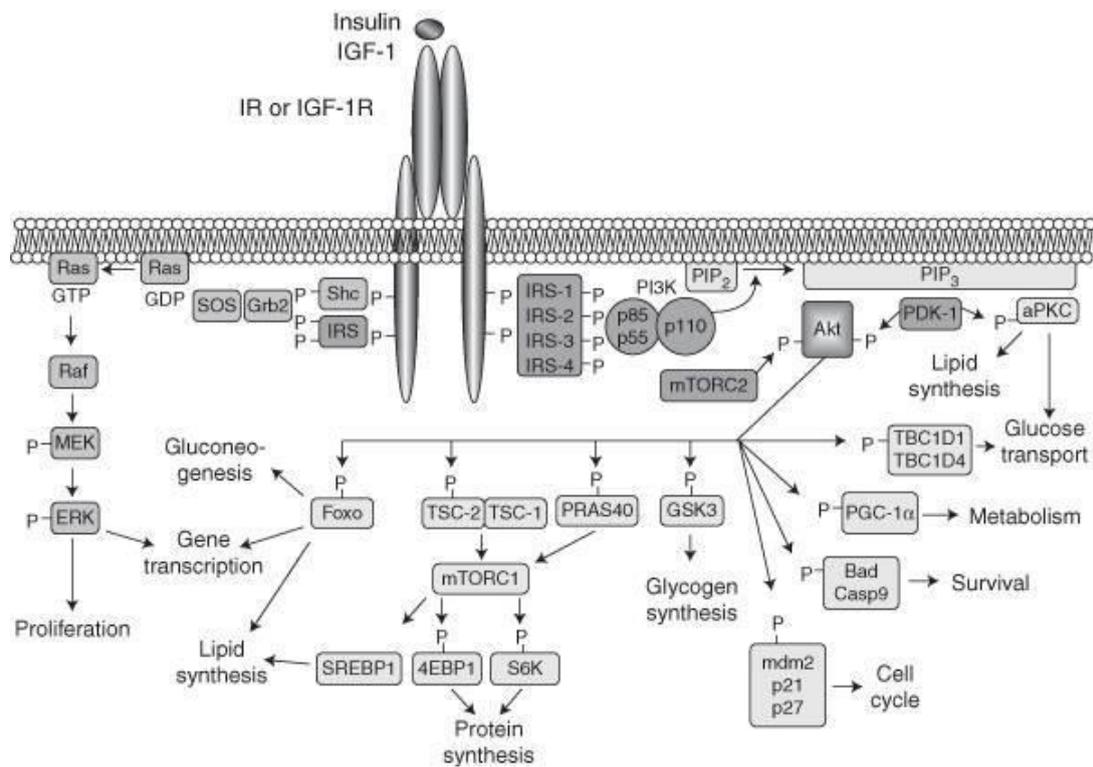


Figura 2. Ruta de señalización de la insulina e IGF-1. La figura muestra la cascada de señalización generada por la activación de IR o IGF-1R. La activación de estos receptores por sus ligandos inicia una cascada de eventos de fosforilación que conducen a la producción de diferentes procesos como la regulación del transporte de glucosa, la síntesis de lípidos, la gluconeogénesis, la síntesis de glucógeno y el control de la proliferación y supervivencia celular (Boucher *et al.*, 2014).

1.3. DIABETES TIPO 2

1.3.1. Diabetes tipo 2 y resistencia a la insulina

La diabetes es una enfermedad metabólica que ocurre cuando la cantidad de glucosa circulante en la sangre es demasiado elevada debido a un cese de la producción de insulina por parte de las células β del páncreas y/o a la resistencia a la insulina en las células diana. En definitiva, se produce una desregulación del metabolismo de la glucosa en el hígado y tejidos periféricos como el músculo.

La diabetes tipo 2 (T2DM) se caracteriza por la resistencia a la insulina. El término de resistencia a la insulina connota la resistencia a los efectos de la insulina en la captación, el metabolismo y el almacenamiento de la glucosa. La insulina, como se ha comentado en apartados anteriores, estimula la capacidad de glucosa en los tejidos. En la resistencia a insulina, no existe la misma capacidad para responder a la acción de la insulina. Se intenta compensar con un aumento de secreción de insulina por parte de las células β pancreáticas, lo que se conoce como hiperinsulinemia. Los individuos que presentan resistencia a insulina son incapaces de secretar suficiente insulina para compensar el defecto de la acción de esta, ya que los tejidos no son capaces de responder correctamente a la insulina. De esa manera, finalmente, se produce un deterioro de las células β debido lo que contribuye junto con la resistencia a insulina al desarrollo de la T2DM (Butler *et al.*, 2003; Khan *et al.*, 1986; Reaven, 2005).

1.3.2. Diabetes tipo 2 y deficiencia de proteínas IRS

La delección del gen *Irs2* en ratones conlleva a un fenotipo con características de T2DM, es decir, los animales deficientes de IRS2 presentan defectos tanto en la acción como en la producción de insulina (Withers *et al.*, 1998). Estos animales se caracterizan por presentar niveles elevados de glucosa en sangre, una tolerancia anormal de la glucosa y resistencia a la insulina. En definitiva, Los ratones deficientes en IRS2 son resistentes a la insulina como resultado de una reducción de la acción de la insulina en el hígado, la grasa y el músculo, y una inadecuada secreción de insulina compensatoria, debido al fallo de las células β pancreáticas, lo que conlleva a un deterioro de la homeostasis de la glucosa (Burks y White, 2007; Withers *et al.*, 1998). En contraposición, la disrupción de IRS1 retarda el crecimiento, pero los ratones no desarrollan diabetes ya que la producción de insulina compensa la resistencia a insulina (Araki *et al.*, 1994)

Una de las razones por las que los ratones deficientes en IRS2 presentan alterada la homeostasis de la glucosa, es la actividad anormal de PI3K. La deficiencia de IRS2 provoca un fallo en este punto de la vía de señalización debido a la actividad anormal de PI3K, conllevando a la resistencia a la insulina. Además, IRS1 no puede suplantar la función de IRS2 ya que el aumento de la actividad de PI3K se ve reducida en los ratones deficientes en IRS2, lo que indica el papel crucial que presenta IRS2 en la señalización de insulina (Araki *et al.*, 1994; Withers *et al.*, 1998).

Las células β juegan un papel fundamental en el desarrollo de la diabetes tipo 2. En estas células, IRS2 presenta un papel fundamental en el desarrollo, proliferación, crecimiento y secreción de insulina, además de ser un importante mediador de la respuesta de las células beta a la resistencia a insulina que previene la diabetes tipo 2 (Hennige *et al.*, 2003). En los ratones deficientes en IRS2, existe una reducción del número de islotes debido a una desregulación de la señalización de IRS2 en las células β , lo que sostiene la incapacidad para poder compensar la resistencia a insulina por parte del páncreas. Esto, junto con la resistencia a insulina, es una de las causas por las que la disrupción de IRS2 provoca diabetes tipo 2. Además, el fallo de las

células β ayuda a mantener la diabetes debido a no poder compensar la resistencia a insulina (Burks y White, 2007; Lin *et al.*, 2004; Withers *et al.*, 1998).

La resistencia a insulina y la diabetes pueden causar también enfermedades neurodegenerativas, sin embargo, no se conoce un patrón molecular claro entre estas enfermedades. Se ha visto que la ruta de señalización de la insulina/IGF-1 tiene una función importante en el desarrollo cerebral, ya que las cascadas de señalización de la vía promueven el crecimiento y supervivencia neuronal. Por supuesto, IRS2 juega un papel importante ya que se ha observado que la delección de IRS2 afecta al tamaño del cerebro, del cerebelo y otras partes del cerebro, además de reducir la proliferación y diferenciación neuronal. La señalización por IRS2 se piensa que es neuroprotectora (Kleinriders *et al.*, 2014; Schubert *et al.*, 2003).

En conclusión, las proteínas IRS y, en particular IRS2, son de gran importancia en la vía de señalización de la insulina e IGF-1. Su mal funcionamiento en los tejidos altera la cascada de señalización de la insulina, lo que deriva en resistencia a la insulina e IGF-1, diabetes tipo 2 y reducción de la proliferación y diferenciación celular, entre otros.

1.3.3. Diabetes y UCP2

La proteína de desacoplamiento mitocondrial (UCP) 2 pertenece a la familia de las UCPs y se trata de un transportador de metabolitos en la mitocondria que se encuentra expresada en el bazo, en los riñones, en el hígado, en páncreas y en el sistema nervioso central. Varios estudios demuestran actualmente que UCP2 contribuye al control de la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y existe una relación entre UCP2 y el metabolismo de la glucosa (Diano y Horvath, 2012).

UCP2 se encuentra sobreexpresada en respuesta a una exposición crónica de glucosa y de ácidos grasos, lo que la relaciona con la obesidad, la hiperglicemia y la diabetes tipo 2 (Fleury *et al.*, 1997). UCP2 es un regulador negativo de la secreción de insulina, por lo que se podría asumir que su inhibición podría tener un efecto positivo en la regulación de la glucosa en sangre. Ratones *knockout* para UCP2, presentan niveles reducidos de glucosa en sangre, una mayor tolerancia a la insulina y una mayor cantidad de contenido de ATP en los islotes, lo que promueve la secreción de insulina (Zhang *et al.*, 2001; 2 Robson-Doucette *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2001). Sin embargo, se ha observado que debido al papel crucial de UCP2 controlando el metabolismo oxidativo a través de la generación de ROS en tejidos centrales y periféricos, parece que el efecto de la supresión de UCP2 a largo plazo tiene un efecto negativo (Broche *et al.*, 2018; Diano y Horvath, 2012).

2. OBJETIVOS

Los principales objetivos del presente trabajo son:

- Determinar la implicación de la vía de señalización de la insulina en tejidos diana de ratones afectados con ataxia de Friedreich, destacando el papel de *Irs2*.
- Determinar la implicación del papel de la expresión del gen mitocondrial *Ucp2* en la ataxia de Friedreich.
- Establecer un buen marcador genético que sirva como gen constitutivo o *Housekeeping* en el análisis de expresión génica.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Los experimentos se realizaron en tejidos de ratones hembra de 24 meses de edad, usando un grupo control y uno modificado genéticamente para desarrollar la Ataxia de Friedreich. Los ratones utilizados como controles pertenecen a la cepa del ratón de fondo puro C57BL/6J (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine), en adelante wt. Los animales que presentan la ataxia de Friedreich, de ratones del modelo murino deficiente en frataxina, YG8R, con genotipo $Fnx^{-/-}$ FXN^{+} , y nomenclatura de cepa B6.Cg-Fxntm1MknTg(FXN)YG8Pook/J (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine). Este modelo se ha generado a partir de un cruce entre ratones transgénicos que presentan las expansiones de GAA en el primer intrón del gen FXN humana con ratones *knockout* completos para la frataxina murina, en adelante YG8R (Mollá *et al.*, 2016) (**Tabla 1**).

Ratón	Edad	Genotipo	Sexo
F1-30	24 meses	wt	Hembra
F2-121			
F2-121			
F2-159			
F2-217			
ATA35	24 meses	YG8R $Fnx^{-/-}$	Hembra
ATA39			
ATA41			
ATA89			
PIL64			

Tabla 1. Ratones control e YG8R empleados. Se indica el nombre, la edad, el genotipo y el sexo de los ratones utilizados como controles (C57BL/6J) y como modelo de la FRDA (YG8R) en el estudio.

De cada animal se analizaron 5 tipos de tejidos distintos: cerebro, cerebelo, músculo, hígado y páncreas. Se partió de una $n=5$ en cada uno de los tejidos estudiados, excepto en el músculo ($n=4$) (**Tabla 2**).

Tejido	wt	YG8R	n
Cerebro	F1-30 F2-121 F2-121 F2-159 F2-217	ATA35 ATA39 ATA41 ATA89 PIL64	n=10
Cerebelo	F1-30 F2-121 F2-121 F2-159 F2-217	ATA35 ATA39 ATA41 ATA89 PIL64	n=10
Músculo	F1-30 F2-121 F2-121 F2-159	ATA35 ATA39 ATA41 PIL64	n=8
Hígado	F1-30 F2-121 F2-121 F2-159 F2-217	ATA35 ATA39 ATA41 ATA89 PIL64	n=10
Páncreas	F1-30 F2-121 F2-121 F2-159 F2-217	ATA35 ATA39 ATA41 ATA89 PIL64	n=10

Tabla 2. Tejidos empleados en el estudio. Se indica cada tejido empleado en el estudio, el número de ratones de los cuales se obtuvieron y la n empleada en cada tejido.

Las muestras biológicas murinas se obtuvieron tras eutanasia por dislocación cervical y disección de las estructuras de interés como son el hígado, el cerebro, el cerebelo, el páncreas y el músculo esquelético. Tras su obtención se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su utilización. En este estudio se trabajó directamente de las muestras ya obtenidas de los ratones (Mollá *et al.*, 2016).

3.2. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE RNA TOTAL

Para la extracción del RNA de las muestras se utilizaron alrededor de 100 mg de cada. El RNA total se obtuvo mediante el protocolo TRIzol Reagent (Invitrogen). Las muestras se disgregaron con el disruptor de tejidos Polytron PT-MR 1600 (Switzerland) sobre hielo durante 30 segundos cada muestra en 1 ml de TRIzol.

Para la separación de las fases se añadió 0,2ml (por 1 ml de Trizol) de Cloroformo, se agita el cada tubo durante 15 segundos en el vórtex y se incuba a temperatura ambiente durante 2-3 minutos. Después se centrifuga a 12.000g (=12.000 rcf) durante 15 minutos a 4°C. Tras esto se tiene una fase acuosa incolora en la parte superior (donde se encuentra el RNA) y se transfiere a un tubo nuevo de 1,5 ml.

A continuación, para la precipitación del RNA, se añadieron 0,5 ml de alcohol isopropílico (por 1 ml de Trizol), 500 µl de alcohol isopropílico. Se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y después se centrifugó a 12.000g durante 10 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante, se lavó el RNA introduciendo 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó a 12.000g durante 10 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante, dejándose secar el precipitado al aire durante 5-10 min para después disolverse en 100 µl de agua libre de RNAsas.

Una extraído el RNA, se purificó mediante el kit RNeasy de Qiagen. Se utilizaron unos 30-50 µg de RNA en un volumen máximo de 100 µl. Se añadieron 350 µl de tampón RLT y 250 µl de etanol al 96-100%. Los 700 µl totales se transfieren a una columna de RNeasy Mini spin que viene acoplada a un tubo de 2 ml. Se centrifuga durante 15 segundos a más de 8.000g y se retira el eluído.

A continuación, antes de continuar con el protocolo, se procedió a una digestión con DNasa (Qiagen). Primero se prepara un mix compuesto por 70 µl de tampón RDD y 10 µl de DNasa por muestra. Después, se añadieron 350 µl de tampón RW1 a la columna, se centrifugó durante 15 segundos a más de 8.000g y se retiró el eluído. Después se añaden los 80 µl de la mezcla de la DNasa a cada tubo y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. Por último, se añadieron 350 µl de tampón RW1, se centrifugó durante 15 segundos a más de 8.000 g, descartándose el eluído. Una vez finalizada la digestión, se realizaron dos lavados con el tampón RPE, para ello se añaden 500 µl de tampón RPE a la columna, se centrifuga 15 segundos a más de 8.000 g descartándose el eluído. Finalmente, se eluyó el RNA con 40 µl de agua y se almacenó a -80°C hasta su uso.

3.3. RETROTRANSCRIPCIÓN DEL RNA

Una vez obtenido el RNA, se usó el kit RNA to cDNA EcoDry™ Premix de Clontech para sintetizar cDNA. Este kit está compuesto de tiras de 8 tubos donde cada tubo contiene un liofilizado con el mix y los componentes necesarios para la reacción; la enzima encargada de la transcripción reversa, la Transcriptasa Reversa (SMART™ MMLV Transcriptasa Reversa), los hexámeros aleatorios y/o oligo(dT), el mix de dNTPs, MgCl₂ como cofactor de la polimerasa, el tampón de la reacción, un crioprotector, BSA y estabilizadores.

Se tomaron 3-5 µg de RNA de cada muestra para obtener un volumen final de 20 µl lo que se añade en cada tubo de EcoDry™ Premix. La síntesis de cDNA se realizó en un termociclador (eppendorf) con las condiciones que se muestran en la **Tabla 3**.

Paso	Temperatura °C	Tiempo
Incubación	42	60 min.
Parada de la reacción	70	10 min.

Tabla 3. Condiciones para la retrotranscripción.

Una vez finalizada la reacción, se introduce todo el volumen de la muestra en tubos eppendorf de 1,5 ml (cDNA concentrado). Una parte del volumen obtenido será utilizado para realizar diluciones de 1:125 del cDNA que se utilizarán para la PCR cuantitativa. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su uso.

3.4. CUANTIFICACIÓN DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

Se cuantificó la cantidad y la calidad de los ácidos nucleicos utilizados (RNA y cDNA) mediante un NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 (ThermoFisher Scientific) utilizando 1 µl de cada muestra. El Nanodrop es un nanoespectrofotómetro que permite medir un espectro UV-visible de cualquier sustancia con tan solo pipetear 1 µl de muestra. Además, también permite conocer la pureza de la muestra. Se midió la pureza de la muestra a 260/280 nm para ácidos nucleicos y a 260/230 para proteínas.

3.5. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN TRANSCRIPCIONAL POR PCR CUANTITATIVA

La determinación del número de copias de los genes que se estudiaron se realizó mediante PCR a tiempo real o PCR cuantitativa, utilizando la tecnología LightCycler 480 II system de Roche usando SYBR Green TB Green™ Premix Ex Taq™ (Tli RNase H Plus). Los genes que se analizaron y sus correspondientes cebadores se muestran en la tabla 4 y el programa del termociclador en la tabla 5. Para un volumen final de 10 µl por reacción, la cantidad de reactivos utilizada en cada una de las placas fue un mix que contiene 4.9 µl de SYBR, 0.1 µl de cada uno de los cebadores y 5 µl de cDNA por cada muestra triplicada en placas de 384 pocillos. Las condiciones de reacción se especifican en la tabla 5, y los Cp detectados se utilizaron para el análisis cuantitativo de los distintos genes analizados. La unicidad y calidad de cada amplicón se analizó mediante el análisis de punto de fusión (Tm calling) (**Figura 3a**) y separación en gel de agarosa al 2%, con posterior tinción con GelRed y observación con radiación UV en un transiluminador de BIO-RAD (**Figura 3b**).

Gen	Nombre	Cebador directo e inverso	Tamaño	Tm (°C)
<i>Irs1</i>	mir1-EXP-F6	CTGGGAGGCCCTCAGGGACC	185	87.73
	mir1-EXP-R6	CTGGGAGGCCCTCAGGGACC		
<i>Irs2</i>	mir2-EXP-F1	GCCGCCGAGCAAAGTGACT	118	92.27
	mir2-EXP-R1	ACTACCGCTGGACGGACGCT		
<i>InsR</i>	mInsr-F1	GGAACGACATTGCCCTGAAG	145	83.39
	mInsr-R1	CCCAGGAGATCTCGGAAGTC		
<i>Igf1</i>	mIgf1-F1	CTTCAGTTCGTGTGTGGACC	148	85.79
	mIgf1-R1	GGGCACAGTACATCTCCAGT		
<i>Igf1R</i>	mIgf1r-F1	TCGATTCGGTGACTTCTGCT	106	82.31
	mIgf1r-R1	TTCTCCAACCTCCGAGGCAAT		
<i>Ucp2</i>	mIgf1r-R1	CCTACAAGACCATTGCACGA	108	84.56
	mUcp2-R1	CATAGGTCACCAGCTCAGCA		
<i>Hprt</i>	mHprt-F1	GCGATGATGAACCAGGTTATGA	146	80.65
	mHprt-F1	GCCTCCCATCTCCTTCATGA		
<i>18s</i>	m18s-F1	AGAAACGGCTACCACATCCA	118	85.17
	m18s-R1	CATTCCAATTACAGGGCCCG		

Tabla 4. Cebadores empleados en la PCR a tiempo real. Se indica el gen, el nombre, la secuencia y el número de nucleótidos de los cebadores directo e inverso empleados en las reacciones de PCR a tiempo real. *Irs1* y *Irs2*: sustrato receptor de insulina; *InsR*: receptor de insulina; *Igf1*: factor de crecimiento de insulina; *Igf1R*: receptor del factor de crecimiento de la insulina; *Ucp2*: Proteína de desacoplamiento 2; *18s*: RNA ribosomal 18s; *Hprt*: Hipoxantina fosforibosiltransferasa.

Paso	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Activación	95	5 min.	1
	95	10 seg.	
Amplificación	63	20 seg.	45
	72	30 seg*	
	95	5 seg.	
Curva de fusión	65	1 min.	1
	97	-	
Enfriamiento	40	30 seg.	1

Tabla 5. Condiciones para la amplificación de los genes por PCR cuantitativa. Se muestra las condiciones necesarias para realizar la PCR cuantitativa. El tiempo marcado con un '*' se trata del momento en el que se produce la detección de fluorescencia.

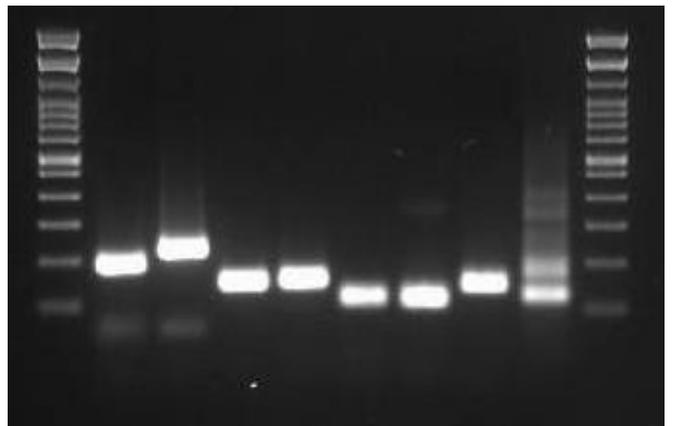
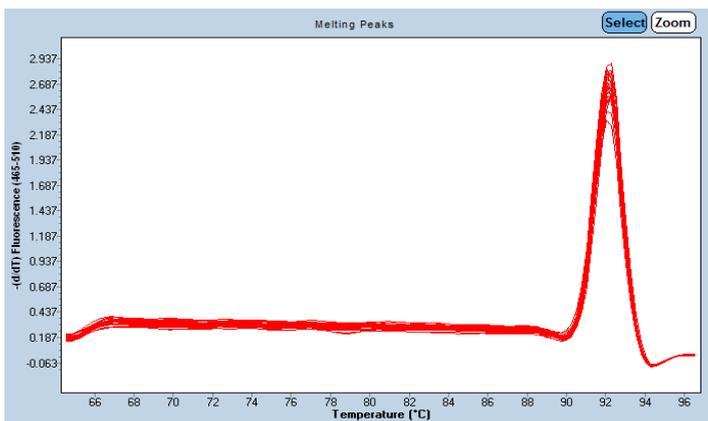


Figura 3. Unicidad y calidad de cada amplicón. (a) Ejemplo de Tm del cebador *Irs2* que indica su temperatura de fusión, se realizó en cada uno de los cebadores para conocer su Tm y comprobar que el amplicón es único. (b) Electroforesis en gel de agarosa de los cebadores empleados en la PCR cuantitativa.

3.6. ANÁLISIS DE LOS DATOS OBTENIDOS MEDIANTE PCR CUANTITATIVA

Los valores de C_p correspondientes a la secuencia amplificada para cada gen de estudio fueron normalizados respecto al valor C_p del control interno, en este caso, los valores obtenidos para *Hprt* y *18s* mediante la ecuación $2^{-D_{Ct}}$.

Una vez se tiene los valores de C_p , hay que realizar los correspondientes análisis estadísticos para comprobar si los resultados obtenidos por la anterior eran estadísticamente significativos. Para esto, se les realizó una *t* de Student usando el programa de representación estadístico Graphpad Prism 8 (Graphpad Software, Inc), considerando los datos estadísticamente significativos si presentaban un $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. ELECCIÓN DE UN GEN *HOUSEKEEPING* ADECUADO PARA EL ESTUDIO

La elección del gen *housekeeping* adecuado a la hora de realizar un análisis de expresión génica es crucial. En el presente trabajo se utilizaron dos genes *housekeeping*, *Hprt* y *18s*, como control interno en la PCR a tiempo real. El gen seleccionado se debe expresar de forma estable y reproducible. Ambos se expresaron de forma estable y se analizó cuál de los dos era más reproducible mediante un análisis de correlación del gen utilizado en distintos ensayos de PCR cuantitativa. El análisis reveló que el coeficiente de correlación de Pearson (R^2), era mejor en *Hprt* (Figura 4a) que en *18s* (Figura 4b) por lo que seleccionamos *Hprt* como gen constitutivo para los estudios de expresión génica.

Cabe destacar también que los resultados de la expresión génica del páncreas para los genes constitutivos son los más bajos de todos los tejidos. Es posible que esto se deba a la complejidad de obtención del tejido o al proceso de extracción de RNA, ya que este tejido es especialmente rico en ribonucleasas y es posible que hayan alterado la extracción de RNA, y en consecuencia los resultados obtenidos en este tejido. Aun así, dentro del rango de valores que toma la expresión de *Hprt* en el páncreas se observa correlación lineal.

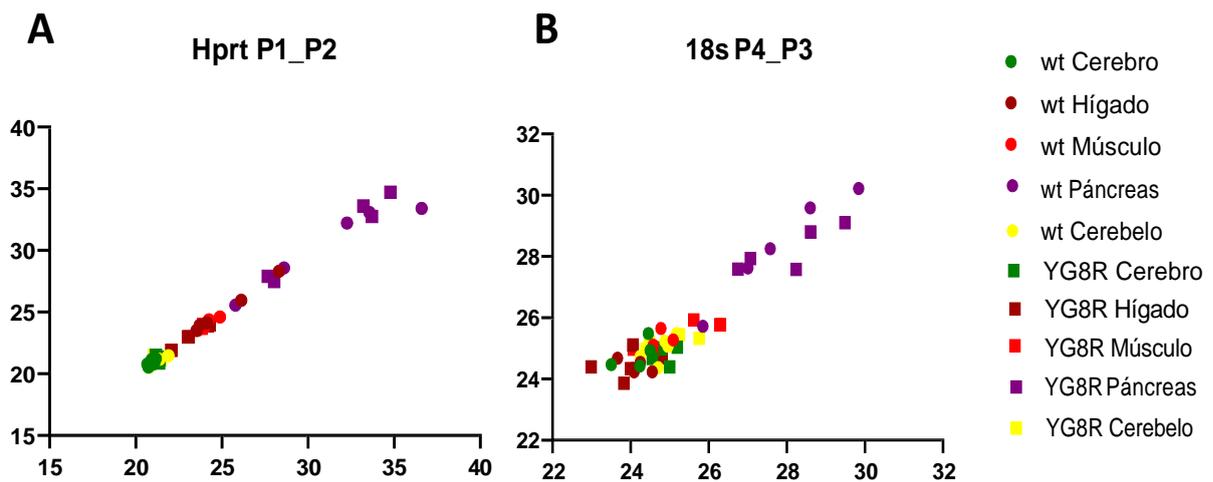


Figura 4. Correlación de los valores de Cp del gen *Hprt* y *18s* entre dos placas de PCR cuantitativa. En el eje de abscisas y ordenadas se sitúan los valores de Cp de la placa 1 y la placa 2 respectivamente. Se puede observar en cada gráfica (A y B) los distintos valores de Cp para *Hprt* (A) y *18s* (B) que toman cada uno de los tejidos en las placas. Se observa una mejor linealidad en los resultados empleando *Hprt*, lo que indica que el experimento es más reproducible y, es por estos resultados por lo que se empleó *Hprt* como gen *housekeeping* para el análisis de expresión génica.

	R²
<i>Hprt</i> Cp Cerebro wt Placa 1 vs Placa2	0,471
<i>Hprt</i> Cp Hígado wt placa 1 vs. Placa 2	0,996
<i>Hprt</i> Cp Músculo wt placa 1 vs. placa 2	0,8964
<i>Hprt</i> Cp Páncreas wt placa 1 vs. placa 2	0,9243
<i>Hprt</i> Cp Cerebelo wt placa 1 vs. placa 2	0,8899
<i>Hprt</i> Cp Cerebro YG8R placa 1 vs. Placa 2	0,5063
<i>Hprt</i> Cp Hígado YG8R placa 1 vs. placa 2	0,9893
<i>Hprt</i> Cp Músculo YG8R placa 1 vs. placa 2	0,6441
<i>Hprt</i> Cp Páncreas YG8R placa 1 vs. placa 2	0,9727
<i>Hprt</i> Cp Cerebelo YG8R placa 1 vs. placa 2	0,09185

Tabla 6. Valores de R² en la correlación de *Hprt*.

	R²
<i>18s</i> Cp Hígado wt placa 3 vs. placa 4	0,4506
<i>18s</i> Cp Músculo wt placa 3 vs. placa 4	0,2134
<i>18s</i> Cp Páncreas wt placa 3 vs. placa 4	0,958
<i>18s</i> Cp Cerebelo wt placa 3 vs. placa 4	0,4628
<i>18s</i> Cp Cerebro wt placa 3 vs. placa 4	0,006121
<i>18s</i> Cp Hígado wt placa 3 vs. placa 4	0,108
<i>18s</i> Cp Músculo YG8R placa 3 vs. Placa 4	0,7843
<i>18s</i> Cp Páncreas YG8R placa 3 vs. placa 4	0,6522
<i>18s</i> Cp Cerebelo YG8R placa 3 vs. placa 4	0,5168

Tabla 7. Valores de R² en la correlación de *18s*.

4.2. SEÑALIZACIÓN DE INSULINA. EXPRESIÓN DE *Irs1*, *Irs2*, *Igf-1*, *InsR* e *Igf1R*

4.2.1. Cerebro

El análisis de expresión génica en cerebro total (porción aleatoria del mismo) reveló una diferencia significativa de *Irs2* entre los ratones controles (wt) y los afectados con FRDA (YG8R), observando una mayor expresión de *Irs1*, *Irs2*, *InsR* e *Igf1*, siendo significativa en todos los casos excepto *InsR*. No se observaron diferencias en *Igf1R*. Tal vez fuera necesario realizar un estudio más amplio a nivel de tejido y tomar una porción amplia de cerebro en la que se vieran representadas todas las partes de éste (Figura 5).

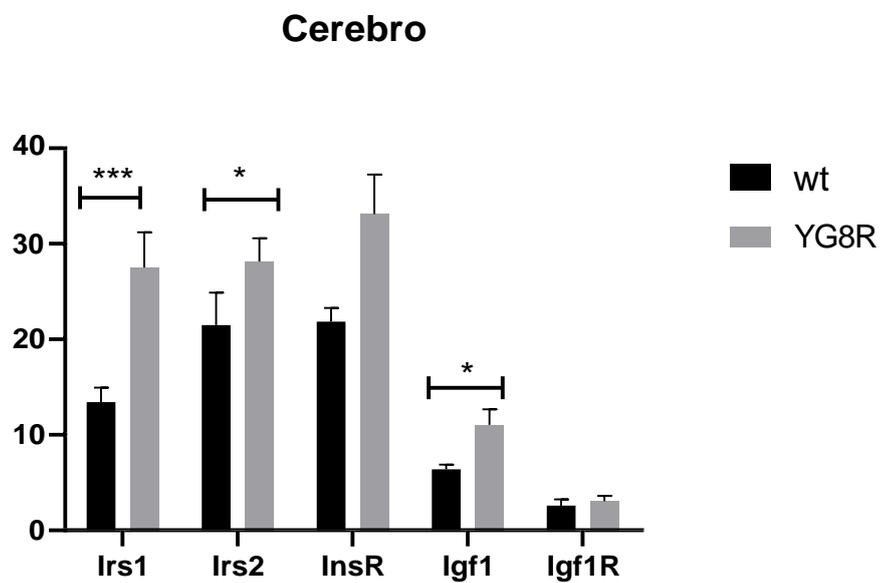


Figura 5. Representación gráfica de la expresión génica de *Irs1*, *Irs2*, *InsR*, *Igf1* e *Igf1R* en cerebro. Se muestra la expresión de dichos genes en ratones controles (wt) y con FRDA (YG8R) con respecto a *Hprt* en cerebro. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante t de Student. Los resultados se representaron según las medias +SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

4.2.2. Cerebelo

El cerebelo es un tejido de gran importancia en la señalización de Insulina, y todos los componentes de la vía de señalización de insulina se expresan de forma elevada. El análisis de expresión génica mostró un descenso significativo en los ratones con ataxia en los genes *Irs2* e *InsR*, y de forma no significativa en *Irs1*. Con respecto a *Igf1* e *Igf1R* no se observan diferencias destacables, salvo una pequeña reducción de expresión de *Igf1* en los ratones con FRDA (Figura 6).

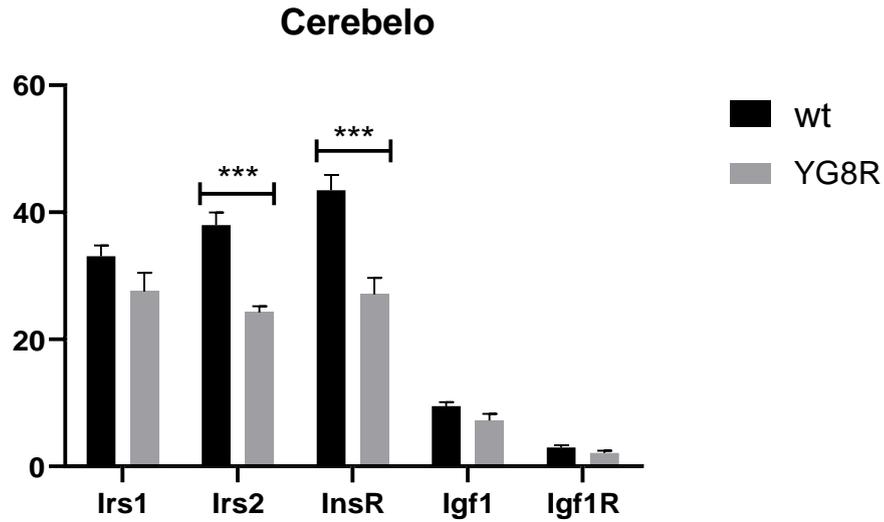


Figura 6. Representación gráfica de la expresión génica de *Irs1*, *Irs2*, *InsR*, *Igf1* e *Igf1R* en cerebelo. Se muestra la expresión de dichos genes en ratones controles (wt) y con FRDA (YG8R), con respecto a *Hprt* en cerebelo. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante t de Student. Los resultados se representaron según las medias + SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

4.2.3. Músculo

El músculo es un tejido periférico diana de la vía de señalización de Insulina y de *Irs2*. El análisis de la expresión génica de los tejidos aislados mostró un descenso significativo para *Irs1* en los ratones YG8R y un aumento significativo de *Irs2*, probablemente como acción compensatoria a *Irs1*. Por otro lado, no se observan diferencias en la expresión del receptor de insulina, *Igf1* e *Igf1R* (Figura 7).

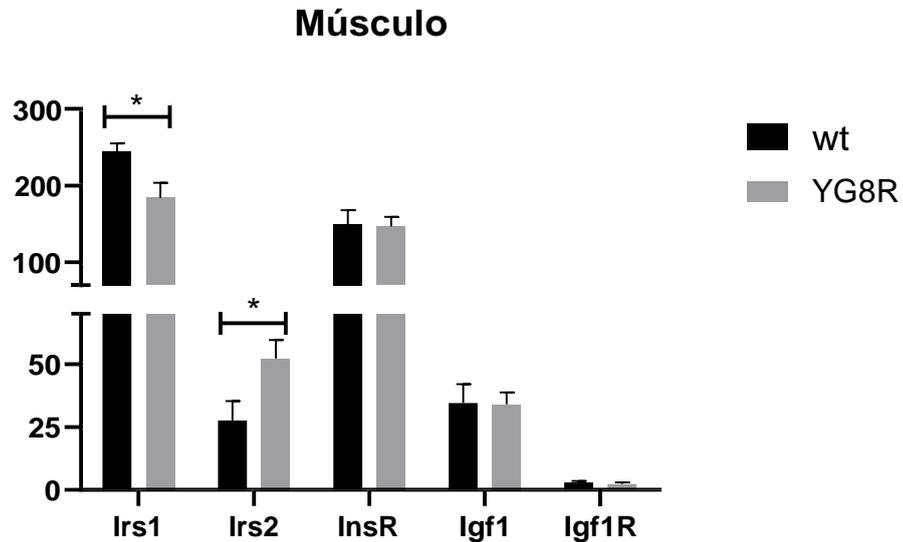


Figura 7. Representación gráfica de la expresión génica de *Irs1*, *Irs2*, *InsR*, *Igf1* e *Igf1R* en músculo. Se muestra la expresión de dichos genes en ratones controles (wt) y con FRDA (YG8R) con respecto a *Hprt* en músculo. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante t de Student. Los resultados se representaron según las medias +SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

4.2.4. Hígado

El hígado es la principal maquina metabólica del organismo, y donde tiene lugar la captación de Insulina para regular de manera principal y a través de *Irs2* el metabolismo de la glucosa. A diferencia de otros órganos analizados, como el cerebro, el cerebelo o el músculo, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los componentes de la vía de señalización, pero sí en *Igf1R*, donde se observó una disminución de la expresión de *Igf1R* en hígados de ratones YG8R (Figura 8).

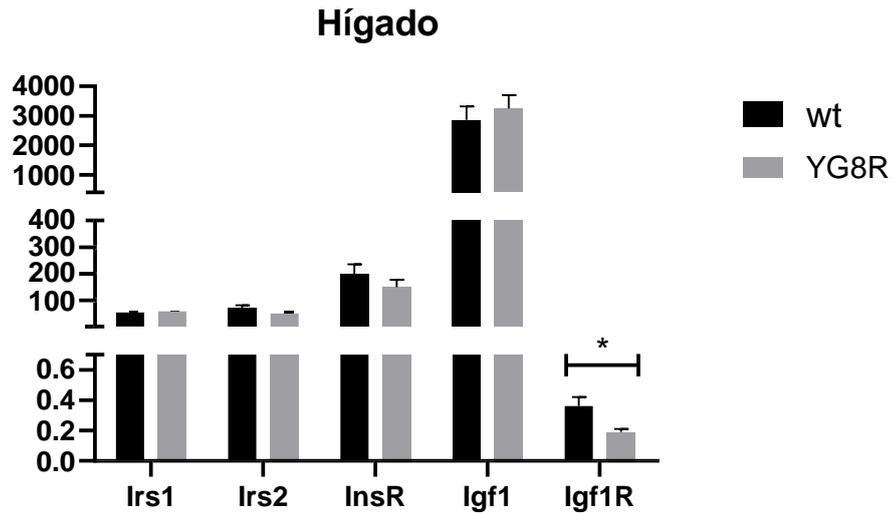


Figura 8. Representación gráfica de la expresión génica de *Irs1*, *Irs2*, *InsR*, *Igf1* e *Igf1R* en hígado. Se muestra la expresión de dichos genes en ratones controles (wt) y con FRDA (YG8R) con respecto a *Hprt* en hígado. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante t de Student. Los resultados se representaron según las medias +SEM. *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001.

4.2.5. Páncreas

El análisis de la expresión en páncreas no reveló diferencias significativas en ninguno de los genes estudiados, aunque sí pudieron observarse incrementos en *Irs1* e *Igf1* y descenso de la expresión en *Igf1R*. El páncreas es un órgano de difícil análisis por expresión génica, debido a que es rico en ribonucleasas, aunque los niveles de rendimiento y pureza de RNA obtenidos se encuentran en rango (A260/280 ~2; a260/230 ~2); el rendimiento de síntesis de cDNA fue menor que en el resto de los tejidos, como evidencian los ensayos con los genes constitutivos, y aunque los resultados son consistentes, tal vez debiera tomarse en cuenta para su interpretación (Figura 9).

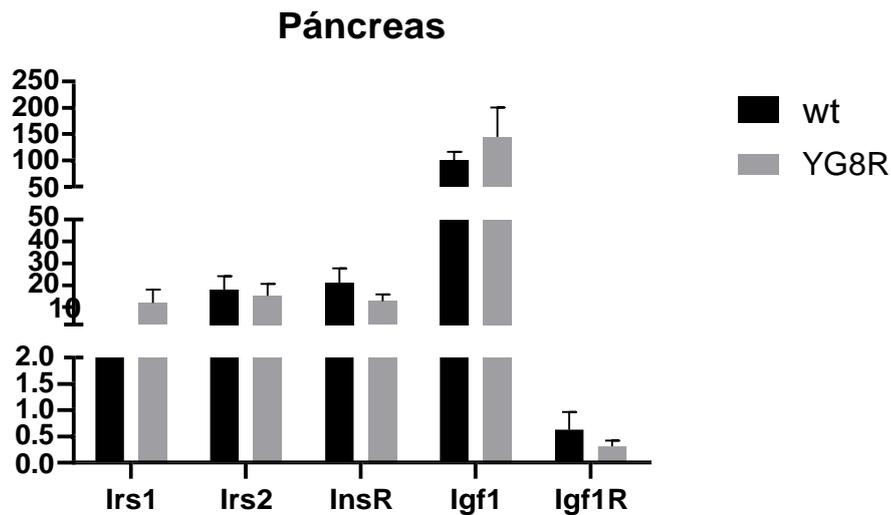


Figura 9. Representación gráfica de la expresión génica de *Irs1*, *Irs2*, *InsR*, *Igf1* e *Igf1R* en páncreas. Se muestra la expresión de dichos genes en ratones controles (wt) y con FRDA (YG8R) con respecto a *Hprt* en páncreas. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante t de Student. Los resultados se representaron según las medias +SEM. *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001.

Tejido	Expresión en ratones con FRDA
Cerebro	Irs1 ↑ Irs2 ↑ InsR ↑ Igf1 ↑ Igf1R —
Cerebelo	↓ Irs1 ↓ Irs2 ↓ InsR Igf1 — Igf1R —
Músculo	↓ Irs1 Irs2 ↑ InsR — Igf1 — Igf1R —
Hígado	Irs1 — Irs2 — InsR — Igf1 — ↓ Igf1R
Páncreas	Irs1 ↑ Irs2 — InsR — Igf1 ↑ Igf1R —

Tabla 8. Expresión de *Irs1*, *Irs2*, *InsR*, *Igf1* e *Igf1R* en tejidos de ratones afectados con FRDA. Recopilación del incremento (fecha roja), disminución (flecha verde) o ningún cambio (-) de la expresión de los genes estudiados en ratones con FRDA.

4.3. EXPRESIÓN DE UCP2

Debido a la implicación de UCP2 en el metabolismo energético y su relación con la resistencia a insulina y, en consecuencia, con la diabetes (Diano y Horvath, 2012), se añadió dicho gen al estudio.

En el cerebro, se puede observar que no existen diferencias en la expresión de *Ucp2* entre los ratones controles y los ratones con FRDA. En el cerebelo se ha comprobado que *Ucp2* se encuentra menos expresado de manera significativa en ratones afectados con la ataxia. Seguidamente, en el músculo, *Ucp2* está menos expresado en ratones con FRDA, aunque la diferencia entre ambos grupos no es significativa. En el hígado, la expresión de *Ucp2* se encuentran también un poco reducida en ratones con ataxia y, por último, en el páncreas de ratones con FRDA está bastante menos expresado, aunque esta diferencia no es significativa. (Figura 10).

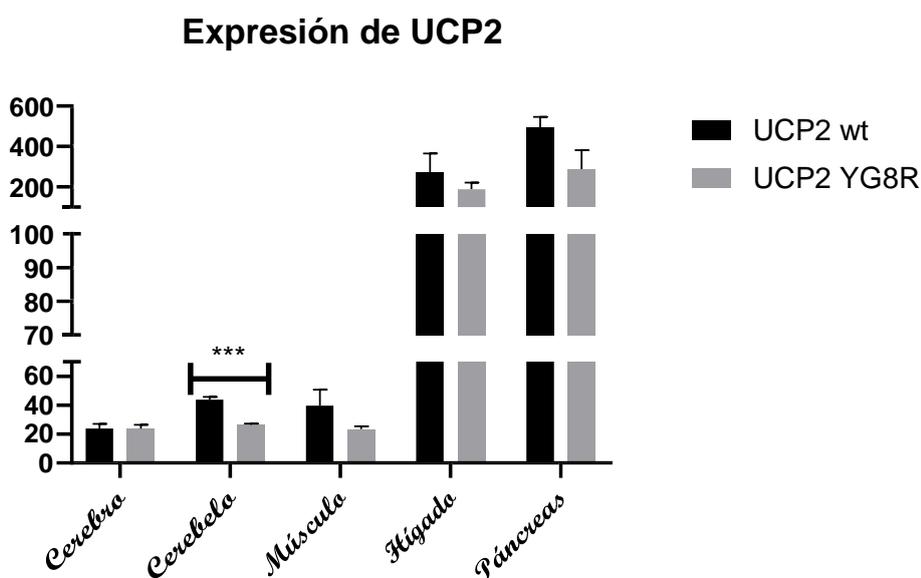


Figura 10. Representación gráfica de la expresión génica de UCP2 en los distintos tejidos. Se muestra la expresión de *Ucp2* ratones con controles (wt) y FRDA (YG8R) con respecto a *Hprt* en cerebro, cerebelo, músculo, hígado y páncreas. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante t de Student. Los resultados se representaron según las medias +SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

5. DISCUSIÓN

La Ataxia de Friedreich es una enfermedad neurodegenerativa que cursa con afectación de las vías propioceptivas del sistema nervioso periférico, la médula espinal y el núcleo dentado del cerebelo en el sistema nervioso central. Está causada por la disminución de los niveles de frataxina en los tejidos. La frataxina se encuentra en las células de todo el organismo, pero los niveles más altos se localizan en el corazón, la médula espinal, el cerebelo, el hígado, el páncreas y el músculo esquelético (González-Cabo y Palau, 2013). Se ha observado en esta patología que alrededor del 30% de los pacientes padecen diabetes de tipo 2 (Harding 1981; De Michele *et al.* 1996), por lo que podría haber una relación entre esta patología y la vía de señalización de la insulina que, en la diabetes de tipo 2, cursa con resistencia a insulina en tejidos periféricos. IRS2 juega un papel fundamental en la resistencia a insulina ya que su deficiencia está directamente relacionada con diabetes tipo 2 (Withers *et al.*, 1998; Burks y White, 2007). Además, se ha visto que la delección de IRS2 afecta también al tamaño del cerebro, del cerebelo y otras partes del cerebro, además de reducir la proliferación y diferenciación neuronal (Kleinriders *et al.*, 2014; Schubert *et al.*, 2003). Para poder abordar la posible relación entre la FRDA y un subsecuente desarrollo de diabetes de tipo 2, se decidió realizar un estudio de análisis de expresión génica de *Irs2* y otros componentes de la vía de señalización de la insulina e IGF-1 como *Irs1*, *Igf1*, *Igf1R*, o *IR*, en aquellos tejidos donde más se pueden ver afectados por la ausencia de frataxina y donde esté implicada la expresión de *Irs2* y otros componentes de la vía de señalización de la insulina, y que incluyen el cerebro, cerebelo, músculo, hígado y páncreas, en un modelo animal de ratón wt y un modelo generado para mostrar el fenotipo de FRDA (YG8R). Además, como la FRDA cursa principalmente con afectación mitocondrial, y también se ha establecido que IRS2 y la diabetes tipo 2 pudiera estar relacionado con la expresión de *Ucp2* (Diano y Horvath, 2012) y jugar un papel en el metabolismo mitocondrial, por lo que también se ha incluido en el estudio.

El análisis de la expresión génica realizada en una porción del cerebro de los animales wt e YG8R reveló una sobreexpresión de los componentes de la vía de señalización de la insulina *Irs1*, *Irs2* e *InsR* en ratones con FRDA. Una posible explicación al aumento de expresión de *Irs1* e *Irs2* en el cerebro, puede ser debido al incremento significativo de la expresión de *Igf1*. El receptor de insulina, aunque tenga más afinidad por la insulina, puede ser estimulado por *Igf1* (Boucher *et al.*, 2014) y ambos receptores activan IRS1 e IRS2. Estos resultados, sin embargo, podrían no ser representativos de la función global del cerebro, ya que se tomó solo una porción de éste (Figuras 11 y 12).

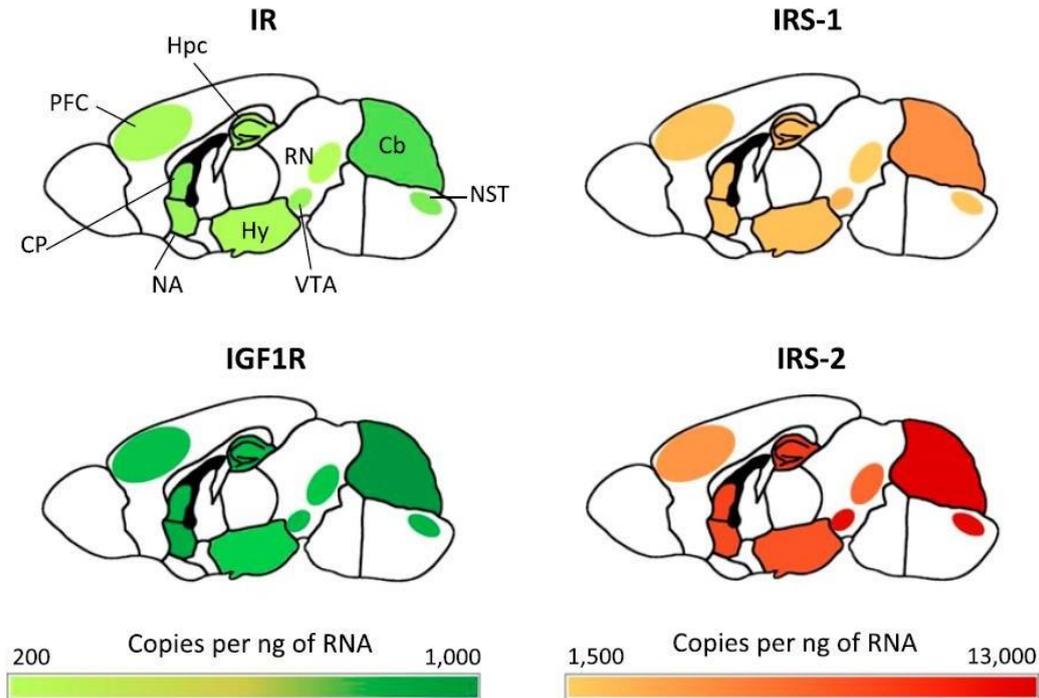


Figura 11. Expresión de IR, IRS-1, IGF1R e IRS-2 en cerebro y cerebelo de ratón. Las zonas coloreadas indican los niveles de expresión de IR e IGF-1R (verde) e IRS1 e IRS2 (rojo) en el cerebro y cerebelo de ratones. Esto indica que la porción aleatoria seleccionada de cerebro pudo no ser representativa ya que la expresión de IR, IRS1, IRS2 e IGF-1R varía según que zonas del cerebro (Kleinridders et al., 2014).

El cerebelo es una fracción del cerebro que se pudo aislar y analizar de forma global. En éste, se observa un patrón de expresión típico de diabetes tipo 2 en ratones con FRDA. La reducción de la expresión de *Irs1*, *Irs2* e *InsR*, indica que el cerebelo presenta una resistencia a la insulina. Esto coincide con la bibliografía, que indica por ejemplo que *Irs2* es determinante en la señalización de insulina y su defecto conlleva a patrones típicos de diabetes (Burks y White, 2007; Withers et al., 1998). En ratones con FRDA no se han observado afecciones a nivel tisular en el cerebelo, pero en humanos sí que se encuentra bastante afectado (Koeppen, 2011), lo que indica que, si en estos ratones ya se observa una alteración de la vía de la insulina, ésta podría estar más afectada en pacientes con FRDA. El cerebelo es un órgano que presenta elevados niveles transcripcionales de todos los componentes de la vía de señalización de la insulina (**Figura 11**), por lo que su función debe ser determinante en el mismo. Es conveniente destacar que en el cerebro y en el cerebelo se observan patrones contrarios. Como estos órganos corresponden a porciones del encéfalo, es posible que esté ocurriendo una acción compensatoria, o tal vez los niveles de insulina e IGF-1 llegan en menor proporción al cerebelo que a otras regiones del cerebro (**Figura 12**).

En el músculo no se observan diferencias en los receptores, pero sí que hay cambios en la expresión de *Irs1* e *Irs2*. La FRDA comienza a manifestarse en las neuronas sensitivas de los nervios periféricos, afectando a la sensibilidad en la médula derivando más tarde en afecciones a nivel muscular (Koeppen, 2011). Como los animales con los que se trabaja son longevos (24 meses), el músculo ya se encuentra afectado por la FRDA, lo que puede explicar la respuesta anómala que está ocurriendo a nivel muscular en la expresión de *Irs1* e *Irs2*. Esto puede ser debido a una acción compensatoria de *Irs2* a la disminución de *Irs1* y a una posible disminución en la entrada de Insulina (**Figura 12**). En este sentido, el análisis del RNA del páncreas de ratones wt e YG8R no reveló diferencias significativas en ninguno de los componentes de la vía de

señalización de Insulina, pero se ha observado, que los animales FRDA, conforme desarrollan la enfermedad producen niveles normales de Insulina en los islotes β pancreáticos pero estos islotes están disminuidos de manera significativa respecto a los ratones wt (González-Cabo y Palau, 2013), confirmando que, aunque la señalización genética se mantenga en los islotes pancreáticos, el número de los mismos es insuficiente para generar la insulina necesaria, que unido a una resistencia periférica puede generar este cuadro de diabetes tipo 2. De igual manera, no se han observados cambios significativos a nivel transcripcional en el hígado, la expresión de *Igf1* está incrementada, puesto que es el principal órgano productor (Ohlsson *et al.*, 2009), en ambos grupos de animales, y su receptor, el *Igf1R* está disminuido en el ratón YG8R, aunque no se observan otros cambios destacables (Figura 12).

Por último, puesto que la FRDA es una enfermedad que afecta a las mitocondrias, y ya que se ha propuesto una relación con *Irs2* (Broche *et al.*, 2018; Diano y Horvath, 2012), se procedió al análisis de éste a nivel transcripcional. Los estudios realizados revelaron que la expresión de *Ucp2* se ve reducida en el cerebro, músculo, hígado y páncreas, indicando una alteración del metabolismo mitocondrial que puede ser debido al daño mitocondrial que causa la FRDA (González-Cabo y Palau, 2013), a la alteración de la expresión de *Irs2*, o a ambas. Recientemente, se ha publicado que la inhibición de UCP2 puede favorecer la reducción de glucosa en sangre en tejidos periféricos y centrales a corto plazo, pero que el efecto a largo plazo de esta inhibición puede ser perjudicial a nivel de la homeostasis de la glucosa (Diano y Horvath, 2012) (Figura 12).

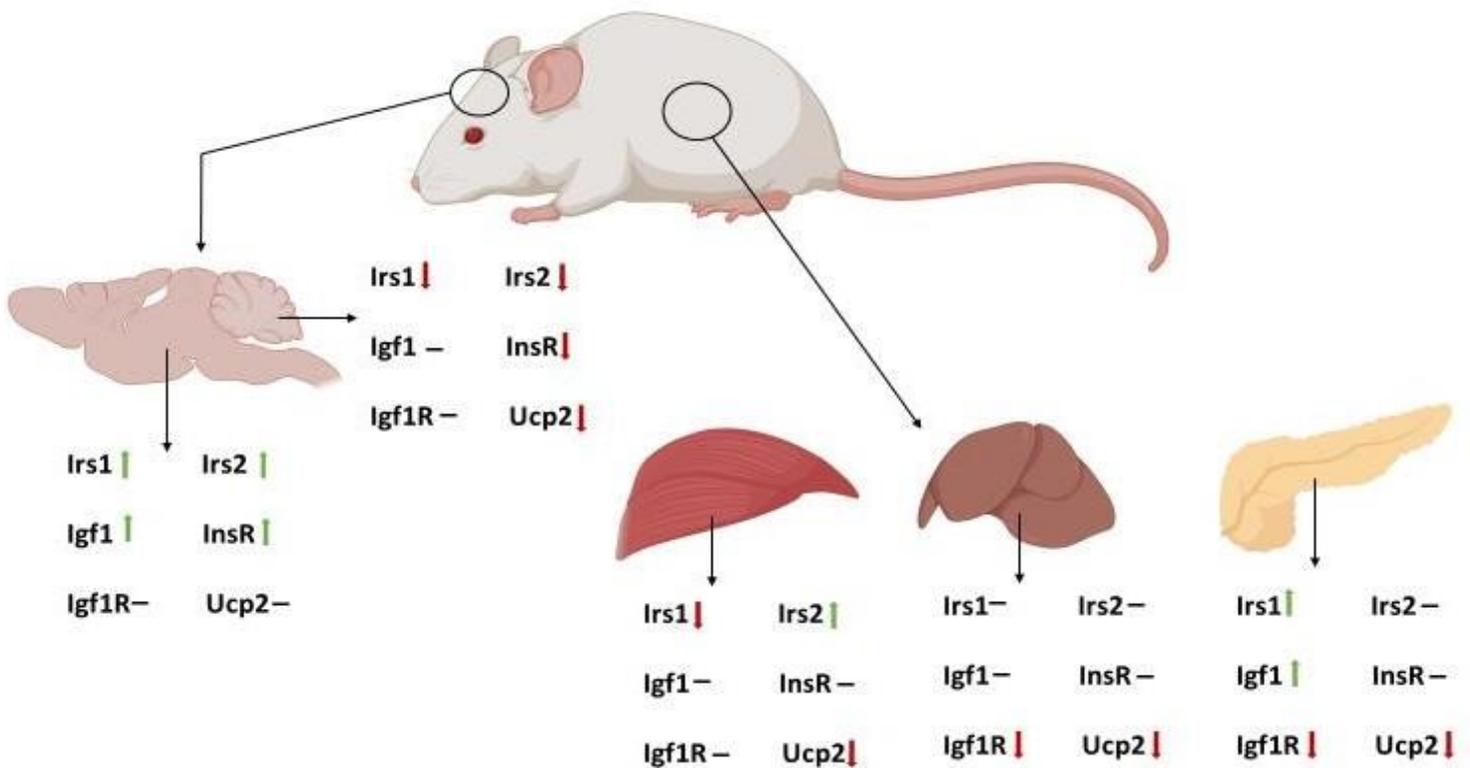


Figura 12. Modelo propuesto de expresión génica. Expresión génica de *Irs1*, *Irs2*, *Igf1*, *InsR*, *Igf1R* y *Ucp2* en cerebro, cerebelo, músculo, hígado y páncreas afectados por FRDA (editada con biorender.com).

6. CONCLUSIONES

1. Se ha realizado un estudio de perfil de expresión génica en tejidos aislados (cerebro, cerebelo, músculo, hígado y páncreas) de ratones wt versus ratones YG8R (ataxia de Friedreich) con el objetivo de establecer una posible relación de la FRDA con la diabetes tipo 2.
2. Se ha establecido un gen constitutivo o *Housekeeping*, *Hprt*, que permite el análisis de la expresión génica en todos los tejidos en este estudio.
3. Se han observado diferencias significativas en cerebro (aumento de expresión de *Irs1*, *Irs2*, *InsR* e *Igf1*), cerebelo (disminución de expresión de *Irs1*, *Irs2* e *InsR*) y músculo (disminución de expresión de *Irs1* y aumento de expresión de *Irs2*).
4. Se ha analizado *Ucp2* por su implicación en la función mitocondrial y posible relación con la diabetes y la FRDA.
5. Existen evidencias que indican una posible relación de FRDA con la diabetes tipo 2 a nivel de expresión génica.

7. BIBLIOGRAFÍA

- ADINOLFI, S., IANNUZZI, C., PRISCHI, F., PASTORE, C., IAMETTI, S., MARTIN, S. R., ... PASTORE, A. (2009). Bacterial frataxin CyaY is the gatekeeper of iron-sulfur cluster formation catalyzed by IscS. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(4), 390–396. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1579>
- ARAKI, E., LIPES, M. A., PATTI, M.-E., BRÜNING, J. C., HAAG III, B., JOHNSON, R. S., Y KAHN, C. R. (1994). Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature*, 372(6502), 186–190. <https://doi.org/10.1038/372186a0>
- ARAKI, E., LIPES, M. A., PATTI, M.-E., BRÜNING, J. C., HAAG III, B., JOHNSON, R. S., Y KAHN, C. R. (1994). Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature*, 372(6502), 186–190. <https://doi.org/10.1038/372186a0>
- BELFIORE, A., FRASCA, F., PANDINI, G., SCIACCA, L., Y VIGNERI, R. (2009). Insulin Receptor Isoforms and Insulin Receptor/Insulin-Like Growth Factor Receptor Hybrids in Physiology and Disease. *Endocrine Reviews*, 30(6), 586–623. <https://doi.org/10.1210/er.2008-0047>
- BELFIORE, A., FRASCA, F., PANDINI, G., SCIACCA, L., Y VIGNERI, R. (2009). Insulin Receptor Isoforms and Insulin Receptor/Insulin-Like Growth Factor Receptor Hybrids in Physiology and Disease. *Endocrine Reviews*, 30(6), 586–623. <https://doi.org/10.1210/er.2008-0047>
- BOUCHER, J., KLEINRIDERS, A., Y KAHN, C. R. (2014). Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009191>
- BROCHE, B., FRADJ, S. BEN, AGUILAR, E., SANCERNI, T., BÉNARD, M., MAKACI, F., DUVILLIÉ, B. (2018). Mitochondrial protein UCP2 controls pancreas development. *Diabetes*. <https://doi.org/10.2337/db17-0118>
- BÜRK, K. (2017). Friedreich Ataxia: current status and future prospects. *Cerebellum & Ataxias*, 4(1). doi: 10.1186/s40673-017-0062-x
- BURKS, D. J., Y WHITE, M. F. (2007). IRS proteins and beta-cell function. *Diabetes*. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.2007.s140>
- CAMPUZANO, V., MONTERMINI, L., MOLTO, M., PIANESE, L., COSSEE, M., Y CAVALCANTI, F. *et al.* (1996). Friedreich's Ataxia: Autosomal Recessive Disease Caused by an Intronic GAA Triplet Repeat Expansion. *Science*, 271(5254), 1423-1427. doi: 10.1126/science.271.5254.1423
- CLEMMONS, D. R. (2004). The relative roles of growth hormone and IGF-1 in controlling insulin sensitivity. *The Journal of Clinical Investigation*, 113(1), 25–27. <https://doi.org/10.1172/JCI20660>
- CNOP, M., IGOILLO-ESTEVE, M., RAI, M., BEGU, A., SERROUKH, Y., DEPONDT, C., ... FÉRY, F. (2012). Central role and mechanisms of β -cell dysfunction and death in friedreich ataxia-associated diabetes. *Annals of Neurology*, 72(6), 971–982. <https://doi.org/10.1002/ana.23698>
- CNOP, M., MULDER, H., Y IGOILLO-ESTEVE, M. (2013). Diabetes in Friedreich Ataxia. *Journal of Neurochemistry*, 126, 94–102. <https://doi.org/10.1111/jnc.12216>

- COHEN, P. (2006). The twentieth century struggle to decipher insulin signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(11), 867–873. <https://doi.org/10.1038/nrm2043>
- COHEN, P., Y FRAME, S. (2001). The renaissance of GSK3. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(10), 769–776. <https://doi.org/10.1038/35096075>
- DE MEYTS, P. (2000). The Insulin Receptor and Its Signal Transduction Network. In *Endotext*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27512793>
- DE MEYTS, P. (2000). The Insulin Receptor and Its Signal Transduction Network. In *Endotext*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27512793>
- DE MICHELE, G., FILLA, A., BARBIERI, F., PERRETTI, A., SANTORO, L., Y TROMBETTA, L. *et al.* (1989). Late onset recessive ataxia with Friedreich's disease phenotype. *Journal Of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 52(12), 1398-1401. doi: 10.1136/jnnp.52.12.139
- Diabetes tipo 1 | NIDDK. (n.d.). Retrieved June 23, 2019, from <https://www.niddk.nih.gov/health-information/informacion-de-la-salud/diabetes/informacion-general/que-es/diabetes-tipo-1>
- DIANO, S., Y HORVATH, T. L. (2012). Mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2) in glucose and lipid metabolism. *Trends in Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.08.003>
- DÜRR, A., COSSEE, M., AGID, Y., CAMPUZANO, V., MIGNARD, C., Y PENET, C. *et al.* (1996). Clinical and Genetic Abnormalities in Patients with Friedreich's Ataxia. *New England Journal Of Medicine*, 335(16), 1169-1175. doi: 10.1056/nejm199610173351601
- DÜVEL, K., YECIES, J. L., MENON, S., RAMAN, P., LIPOVSKY, A. I., SOUZA, A. L., ... MANNING, B. D. (2010). Activation of a Metabolic Gene Regulatory Network Downstream of mTOR Complex 1. *Molecular Cell*, 39(2), 171–183. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.06.022>
- EIZIRIK, D. L., CARDOZO, A. K., Y CNOP, M. (2008). The Role for Endoplasmic Reticulum Stress in Diabetes Mellitus. *Endocrine Reviews*, 29(1), 42–61. <https://doi.org/10.1210/er.2007-0015>
- FLEURY, C., NEVEROVA, M., COLLINS, S., RAIMBAULT, S., CHAMPIGNY, O., LEVI-MEYRUEIS, C., ... WARDEN, C. H. (1997). Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nature Genetics*, 15(3), 269–272. <https://doi.org/10.1038/ng0397-269>
- GONZÁLEZ-CABO, P., Y PALAU, F. (2013). Mitochondrial pathophysiology in Friedreich's ataxia. *Journal Of Neurochemistry*, 126, 53-64. doi: 10.1111/jnc.12303
- GÓRECKI, D. C., BERĘSEWICZ, M., Y ZABŁOCKA, B. (2007). Neuroprotective effects of short peptides derived from the Insulin-like growth factor 1. *Neurochemistry International*, 51(8), 451–458. <https://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2007.04.030>
- HARDING A. (1981). Friedreich's ataxia: a clinical and genetic study of 90 families with an analysis of early diagnostic criteria and intrafamilial clustering of clinical features. *Brain*, 104(3), 589-620. doi: 10.1093/brain/104.3.589

- HENNIGE, A. M., BURKS, D. J., OZCAN, U., KULKARNI, R. N., YE, J., PARK, S., ... WHITE, M. F. (2003). Upregulation of insulin receptor substrate-2 in pancreatic β cells prevents diabetes. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI18581>
- KAHN, B. B., Y FLIER, J. S. (2000). Obesity and insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 106(4), 473–481. <https://doi.org/10.1172/JCI10842>
- KLEINRIDERS, A., FERRIS, H. A., CAI, W., Y KAHN, C. R. (2014). Insulin Action in Brain Regulates Systemic Metabolism and Brain Function. *Diabetes*, 63(7), 2232. <https://doi.org/10.2337/DB14-0568>
- KLEINRIDERS, A., FERRIS, H. A., CAI, W., Y KAHN, C. R. (2014). Insulin Action in Brain Regulates Systemic Metabolism and Brain Function. *Diabetes*, 63(7), 2232. <https://doi.org/10.2337/DB14-0568>
- KOEPPE, A. H. (2011). Friedreich's ataxia: Pathology, pathogenesis, and molecular genetics. *Journal of the Neurological Sciences*, 303(1–2), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2011.01.010>
- LIN, X., TAGUCHI, A., PARK, S., KUSHNER, J. A., LI, F., LI, Y., Y WHITE, M. F. (2004). Dysregulation of insulin receptor substrate 2 in β cells and brain causes obesity and diabetes. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI22217>
- MARMOLINO, D. (2011). Friedreich's ataxia: Past, present and future. *Brain Research Reviews*, 67(1-2), 311-330. doi: 10.1016/j.brainresrev.2011.04.001
- MONTERMINI, L., ANDERMANN, E., LABUDA, M., RICHTER, A., PANDOLFO, M., CAVALCANTI, F., ... COCOZZAS. (1997). The Friedreich ataxia GAA triplet repeat: premutation and normal alleles. *Human Molecular Genetics*, 6(8), 1261–1266. <https://doi.org/10.1093/hmg/6.8.1261>
- NUSSEY, S., Y WHITEHEAD, S. (2001). *The endocrine pancreas*. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK30/>
- PANDOLFO, M. (2008). Friedreich Ataxia. *Archives Of Neurology*, 65(10). doi: 10.1001/archneur.65.10.1296
- PANDOLFO, M., Y PASTORE, A. (2009). The pathogenesis of Friedreich ataxia and the structure and function of frataxin. *Journal Of Neurology*, 256(S1), 9-17. doi: 10.1007/s00415-009-1003-2
- PERUZZI, F., PRISCO, M., DEWS, M., SALOMONI, P., GRASSILLI, E., ROMANO, G., ... BASERGA, R. (2015). Multiple Signaling Pathways of the Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor in Protection from Apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.10.7203>
- POLO, J., CALLEJA, J., COMBARROS, O., Y BERCIANO, J. (1991). Hereditary ataxias and paraplegias in cantabria, spain. *Brain*, 114(2), 855-866. doi: 10.1093/brain/114.2.855
- REAVEN, G. M. (1995). Pathophysiology of insulin resistance in human disease. *Physiological Reviews*, 75(3), 473–486. <https://doi.org/10.1152/physrev.1995.75.3.473>
- REAVEN, GERALD M. (2005). THE INSULIN RESISTANCE SYNDROME: Definition and Dietary Approaches to Treatment. *Annual Review of Nutrition*, 25(1), 391–406. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.24.012003.132155>

- ROBSON-DOUCETTE, C. A., SULTAN, S., ALLISTER, E. M., WIKSTROM, J. D., KOSHKIN, V., BHATACHARJEE, A., ... WHEELER, M. B. (2011). β -cell uncoupling protein 2 regulates reactive oxygen species production, which influences both insulin and glucagon secretion. *Diabetes*. <https://doi.org/10.2337/db11-0132>
- RÖTIG, A., DE LONLAY, P., CHRETIEN, D., FOURY, F., KOENIG, M., Y SIDI, D. *et al.* (1997). Aconitase and mitochondrial iron–sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nature Genetics*, *17*(2), 215–217. doi: 10.1038/ng1097-215
- SANO, H., KANE, S., SANO, E., MIINEA, C. P., ASARA, J. M., LANE, W. S., ... LIENHARD, G. E. (2003). Insulin-stimulated Phosphorylation of a Rab GTPase-activating Protein Regulates GLUT4 Translocation. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(17), 14599–14602. <https://doi.org/10.1074/jbc.C300063200>
- SCHLESSINGER, J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, *103*(2), 211–225. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00114-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00114-8)
- SCHMUCKER, S., MARTELLI, A., COLIN, F., PAGE, A., WATTENHOFER-DONZÉ, M., REUTENAUER, L., Y PUCCIO, H. (2011). Mammalian Frataxin: An Essential Function for Cellular Viability through an Interaction with a Preformed ISCU/NFS1/ISD11 Iron-Sulfur Assembly Complex. *PLoS ONE*, *6*(1), e16199. doi: 10.1371/journal.pone.0016199
- SCHUBERT, M., BRAZIL, D. P., BURKS, D. J., KUSHNER, J. A., YE, J., FLINT, C. L., ... WHITE, M. F. (2003). Insulin receptor substrate-2 deficiency impairs brain growth and promotes tau phosphorylation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*.
- SHAW, L. M. (2011). The insulin receptor substrate (IRS) proteins: at the intersection of metabolism and cancer. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, *10*(11), 1750–1756. <https://doi.org/10.4161/cc.10.11.15824>
- SHEPHERD, P. R., WITHERS, D. J., Y SIDDLE, K. (1998). Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *The Biochemical Journal*, *333* (Pt 3) (Pt 3), 471–490. <https://doi.org/10.1042/bj3330471>
- SKOLNIK, E. Y., LEE, C. H., BATZER, A., VICENTINI, L. M., ZHOU, M., DALY, R., ... WHITE, M. F. (1993). The SH2/SH3 domain-containing protein GRB2 interacts with tyrosine-phosphorylated IRS1 and Shc: implications for insulin control of ras signalling. *The EMBO Journal*, *12*(5), 1929–1936. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8491186>
- TANIGUCHI, C. M., EMANUELLI, B., Y KAHN, C. R. (2006). Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *7*(2), 85–96. <https://doi.org/10.1038/nrm1837>
- TZIVION, G., DOBSON, M., Y RAMAKRISHNAN, G. (2011). FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1813*(11), 1938–1945. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.06.002>
- VANKAN, P. (2013). Prevalence gradients of Friedreich's Ataxia and R1b haplotype in Europe co-localize, suggesting a common Palaeolithic origin in the Franco-Cantabrian ice age refuge. *Journal Of Neurochemistry*, *126*, 11–20. doi: 10.1111/jnc.12215

WARD, C. W., MENTING, J. G., Y LAWRENCE, M. C. (2013). The insulin receptor changes conformation in unforeseen ways on ligand binding: Sharpening the picture of insulin receptor activation. *BioEssays*, 35(11), 945–954. <https://doi.org/10.1002/bies.201300065>

What is Diabetes? | NIDDK. (n.d.). Retrieved June 23, 2019, from <https://www.niddk.nih.gov/health-information/diabetes/overview/what-is-diabetes>

WHITE, M. F. (2002). IRS proteins and the common path to diabetes. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 283(3), E413–E422. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00514.2001>

WILCOX, G. (2005). Insulin and insulin resistance. *The Clinical Biochemist. Reviews*.

WITHERS, D. J., GUTIERREZ, J. S., TOWERY, H., BURKS, D. J., REN, J.-M., PREVIS, S., ... WHITE, M. F. (1998a). Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature*, 391(6670), 900–904. <https://doi.org/10.1038/36116>

WITHERS, D. J., GUTIERREZ, J. S., TOWERY, H., BURKS, D. J., REN, J.-M., PREVIS, S., ... WHITE, M. F. (1998b). Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature*, 391(6670), 900–904. <https://doi.org/10.1038/36116>

WITHERS, D. J., GUTIERREZ, J. S., TOWERY, H., BURKS, D. J., REN, J.-M., PREVIS, S., ... WHITE, M. F. (1998). Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature*, 391(6670), 900–904. <https://doi.org/10.1038/36116>.

ZHANG, C. Y., BAFFY, G., PERRET, P., KRAUSS, S., PERONI, O., GRUJIC, D., ... LOWELL, B. B. (2001). Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes. *Cell*, 105(6), 745–755. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00378-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00378-6)