



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE  
VALENCIA**

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA  
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL

**“Caracterización de genes del Sistema  
Nervioso Central relacionados con IRS2 y  
la diabetes”**

Trabajo Fin de Grado en Biotecnología

Curso académico: 2016-2017

Autor: ALBERTO MARTÍNEZ MIRALLES

Tutor Académico: LYNNE PAULA YENUSH

Cotutor: DEBORAH BURKS

VALENCIA, JUNIO DE 2017



**Autor:** ALBERTO MARTÍNEZ MIRALLES

**Tutor Académico:** LYNNE PAULA YENUSH

**Cotutor:** DEBORAH BURKS

**Localidad y fecha:** Valencia, Junio de 2017

**TÍTULO, RESUMEN Y PALABRAS CLAVE:**

**Título:** “Caracterización de genes del Sistema Nervioso Central relacionados con IRS2 y la diabetes”.

**Resumen:**

La diabetes mellitus de tipo 2 es una enfermedad metabólica que se caracteriza por defectos tanto en la acción de la insulina como en la secreción de insulina. La insulina es una hormona clave en la regulación del metabolismo energético y de la glucosa en el cuerpo. Actúa estimulando las células del hígado, músculo y grasa para incorporar la glucosa de la sangre y almacenarla como glucógeno en el hígado y músculo y además se ha demostrado que juega un papel clave en otros tejidos como el cerebro donde se ha señalado una posible relación entre resistencia a insulina y Alzheimer. Los efectos celulares de la insulina están mediados principalmente por las proteínas IRS (del inglés Insulin Receptor Substrate). Los receptores de insulina fosforilan y activan las proteínas IRS que actúan como sitios de unión para las distintas moléculas de señalización que orquestan la respuesta celular a insulina. La familia de las proteínas IRS está formada por 4 miembros: IRS1, IRS2, IRS3 y IRS4. La forma IRS2 presenta un determinado dominio que el resto de componentes de la familia no poseen y le permite interactuar con el dominio con actividad quinasa del receptor de insulina. Además, IRS2 está presente en todos los tejidos del organismo humano y de ratón. Los ratones mutantes para IRS2 (KO) presentan defectos en la señalización por insulina y la masa de las células  $\beta$  del páncreas disminuye.

La pérdida de IRS2 en ratones provoca un fenotipo diabético caracterizado por machos obesos y hembras obesas e infértiles. En todos los casos se observa un cerebro de tamaño reducido, con una disminución del 50% en la proliferación neuronal y un aumento en la hiperfosforilación de la proteína Tau, marcador de neurodegeneración.

El objetivo principal se basa en determinar si existe alguna relación entre la ausencia de IRS2 y la expresión de distintos genes en el sistema nervioso central (SNC) relacionados con patologías neurológicas, estrés oxidativo y apoptosis (Phgdh, Commd9, Atm, Nrf2, etc). Para ello se analizará el perfil transcripcional de cerebros de ratones *wild type* y *knock out* para IRS2, con el objetivo de definir cambios relacionados con la progresión de la hiperglicemia y envejecimiento en machos y hembras en este modelo animal de la diabetes tipo 2.

**Abstract:**

Type 2 diabetes mellitus is a metabolic disease characterized by defects in the action of insulin and the secretion of insulin. Insulin is a key hormone in the regulation of energy metabolism and glucose in the body. It stimulates the liver, muscle and fat cells to incorporate glucose from the blood and store it as glycogen in the liver and muscle and has also been shown to play a key role in other tissues such as the brain where has been identified a possible relationship between insulin resistance and Alzheimer's disease. The cellular effects of the insulin are mainly mediated by IRS proteins (Insulin Receptor Substrate). Insulin receptors phosphorylate and activate IRS proteins which act as binding sites for the different signaling molecules that lead the cellular response to insulin. The family of IRS proteins consists of 4 members: IRS1, IRS2, IRS3 and IRS4. The IRS2 form presents a specific domain that the other components of the family do not have and allows it to interact with the domain kinase of the insulin receptor. In addition, IRS2 is present in all tissues of the human and mouse organism. Mutant mice for IRS2 (KO) have defects in insulin signaling and the mass of the pancreatic  $\beta$  cells decreases.

The absence of IRS2 in mice causes a diabetic phenotype characterized by obese males and obese and infertile females. In all cases a small brain is observed, with a 50% decrease in neuronal proliferation and an increase in hyperphosphorylation of the Tau protein, a marker of neurodegeneration.

The main objective is to determine if there is any relationship between the absence of IRS2 and the expression of different genes in the central nervous system (CNS) related to neurological pathologies, oxidative stress and apoptosis (Phgdh, Commd9, Atm, Nrf2, etc.). The transcriptional profile of brains of wild type and knock out mice for IRS2 will be analyzed, to define changes related to the progression of hyperglycemia and aging in males and females in this animal model of type 2 diabetes.

**Palabras clave:**

IRS2, glucosa, estrés oxidativo, cerebro.

**Key words:**

IRS2, glucose, oxidative stress, brain.

## **AGRADECIMIENTOS:**

A mi familia.

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 DIABETES .....	1
1.2 INSULINA .....	2
1.3 RECEPTOR DE INSULINA (IR) Y FAMILIA DE PROTEÍNAS IRS.....	3
1.3.1 Receptor de insulina.....	3
1.3.2 Familia de proteínas IRS .....	4
1.4 RELACIÓN DE LA DIABETES CON LAS PROTEÍNAS IRS .....	6
1.4.1 IRS2.....	6
1.5 IRS2 Y SU IMPLICACIÓN EN EL CEREBRO. DIABETES TIPO 3.....	7
1.6 ESTRÉS OXIDATIVO.....	8
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
3.1 MODELO ANIMAL.....	10
3.2 OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE TEJIDO.....	11
3.3 ESTUDIO DE EXPRESIÓN GÉNICA.....	11
3.3.1 Extracción de RNA a partir de las muestras de tejido .....	11
3.3.1.1 Determinación de la concentración y calidad del RNA.....	11
3.3.1.2 Tratamiento con DNAsas y purificación.....	11
3.3.2 Obtención de cDNA por retrotranscripción .....	11
3.3.3 Análisis de expresión.....	12
3.3.3.1 Cebadores utilizados.....	12
3.3.3.2 PCR cuantitativa (Real-Time PCR) .....	14
3.3.3.3 Análisis de los datos.....	15
3.4 ENSAYOS DE INMUNOFLUORESCENCIA SOBRE TEJIDO CEREBRAL.....	15
3.4.1 Inclusión de tejidos en OCT y obtención de cortes .....	15
3.4.2 Inmunohistoquímica .....	15
3.4.3 Tinciones Hematoxilina/Eosina. ....	17
4. RESULTADOS .....	17
4.1 TAMAÑO CEREBRAL EN RATONES DEFICIENTES EN IRS2.....	17
4.2 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.....	17
4.2.1 Genes diferencialmente expresados en cerebro .....	18
4.2.2 Marcadores de la vía de señalización Nrf2 .....	20
4.2.2.1 Caracterización de genes antioxidantes en ratones machos .....	20

4.2.2.2 Relación niveles de expresión-niveles de glucosa .....	21
4.2.2.3 Caracterización de genes antioxidantes en ratones hembra .....	22
4.3 DETECCIÓN DE NRF2 Y P62 SOBRE TEJIDO CEREBRAL .....	24
4.3.1 Diferencias cerebrales a nivel del hipocampo .....	24
4.3.2 Caracterización de la expresión de marcadores antioxidantes .....	25
5. DISCUSIÓN.....	26
6. CONCLUSIONES .....	29
7. BIBLIOGRAFÍA .....	29

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Gen de la insulina: secuencia de RNA de la insulina y mRNA tras eliminar las secuencias intrónicas .....	2
<b>Figura 2.</b> Estructura del receptor de insulina .....	4
<b>Figura 3.</b> Estructura de las proteínas IRS .....	6
<b>Figura 4.</b> Vía de señalización de Nrf2 estimulada por el estrés oxidativo .....	9
<b>Figura 5.</b> Distribución de los cortes cerebrales y los anticuerpos incubados sobre ellos .....	16
<b>Figura 6.</b> Diferencias en el tamaño cerebral .....	17
<b>Figura 7.</b> Representación gráfica de los niveles de mRNA de genes diferencialmente expresados en cerebro.....	19
<b>Figura 8.</b> Representación gráfica de los niveles de mRNA de marcadores de la vía de señalización de Nrf2 en ratones macho jóvenes .....	21
<b>Figura 9.</b> Relación entre los niveles de mRNA de marcadores de la vía de señalización de Nrf2 con los niveles de glucosa .....	22
<b>Figura 10.</b> Representación gráfica de los niveles de mRNA de marcadores de la vía de señalización de Nrf2 en ratones hembra jóvenes .....	23
<b>Figura 11.</b> Representación gráfica de los niveles de mRNA de marcadores de la vía de señalización de Nrf2 en ratones hembra jóvenes y adultas .....	24
<b>Figura 12.</b> Cortes cerebrales correspondientes al hipocampo de ratones macho jóvenes .....	24
<b>Figura 13.</b> Caracterización de Nrf2 sobre el hipocampo de tejido cerebral de ratones macho jóvenes .....	25
<b>Figura 14.</b> Caracterización de p62 sobre el hipocampo de tejido cerebral de ratones macho jóvenes .....	26

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Condiciones de la reacción de retrotranscripción .....	12
<b>Tabla 2.</b> Lista de cebadores de genes cuya expresión es diferencial entre ratones WT y KO para IRS2 .....	13
<b>Tabla 3.</b> Lista de <i>primers</i> de genes relacionados con la vía de señalización del factor de transcripción Nrf2 y la respuesta a estrés oxidativo .....	13
<b>Tabla 4.</b> Condiciones de temperatura y tiempo en las que se llevaron a cabo las Real-Time PCR.....	14
<b>Tabla 5.</b> Listado de anticuerpos que se utilizaron para llevar a cabo los ensayos de inmunofluorescencia .....	16
<b>Tabla 6.</b> Ensayos de expresión génica .....	18

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 DIABETES

La diabetes mellitus (DM) es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglicemia debido a defectos en la secreción de insulina, la acción de la insulina o ambas. La hiperglicemia crónica de la diabetes está asociada con daños a largo plazo, disfuncionalidad y fallos en varios órganos, especialmente ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos. La gran mayoría de los casos de diabetes se dividen en dos amplias categorías. Una de ellas es la diabetes tipo 1 (5-10% de los casos), cuya causa consiste en una absoluta deficiencia en la secreción de insulina, y en ella se produce una destrucción autoinmune mediada por células de las células  $\beta$  del páncreas. Dicha destrucción autoinmune tiene múltiples predisposiciones genéticas y también está relacionada con factores ambientales. La otra categoría corresponde a la diabetes tipo 2 (90-95% de los casos) que consiste en resistencia a la acción de la insulina junto con una respuesta insuficiente de secreción de insulina compensatoria. En la diabetes tipo 2 no se produce la destrucción autoinmune que se produce en la tipo 1 (*Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*, 2007).

La diabetes tipo 2 generalmente resulta de la resistencia a la acción de la insulina sobre la captación de glucosa, el metabolismo de los carbohidratos y los lípidos en los tejidos periféricos y de anormalidades en la secreción de insulina (DeFronzo *et al.*, 1991).

Los defectos en la acción de la insulina usualmente preceden al desarrollo de hiperglucemia, ya que el aumento de la secreción de insulina compensa inicialmente el estado de resistencia a dicha hormona (Taylor *et al.*, 1994). Esto se puede conseguir aumentando la secreción de insulina por célula o aumentando la masa de células  $\beta$  del páncreas. El aumento de la masa de las células  $\beta$  del páncreas se produce por replicación de células  $\beta$  preexistentes a través del proceso de neogénesis o por cambios en la supervivencia de células  $\beta$  (Pick *et al.*, 1998). De hecho, las células beta tienen una reserva compensatoria, de tal manera que la hiperplasia de los islotes y la hiperinsulinemia pueden mantener la homeostasis normal de la glucosa ante la extrema resistencia a la insulina, como se ha demostrado en varios modelos murinos (Brüning *et al.*, 1997). Así, la diabetes aparece cuando esta sobreproducción de insulina falla. En los seres humanos, la diabetes tipo 2 ocurre cuando las reservas de insulina no compensan los defectos en la acción de la insulina.

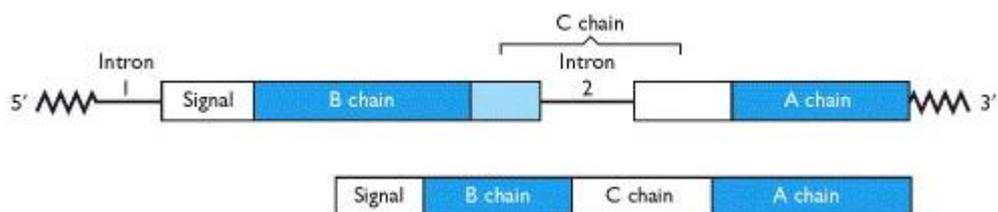
## 1.2 INSULINA:

La insulina es una hormona sintetizada por las células  $\beta$  del páncreas. Fue la primera proteína en tener su estructura primaria de aminoácidos secuenciada en 1955 (Sanger, 1988) y la primera que se produjo en su totalidad por síntesis química (Du *et al.*, 1961).

En ausencia de insulina se producen muchos desórdenes metabólicos debido a fallos en muchas células del cuerpo relacionados con la utilización de glucosa y aminoácidos (Steiner, 1985).

El gen de la insulina humana (Figura 1) se localiza en el brazo corto del cromosoma 11 (Harper *et al.*, 1981) y codifica un péptido constituido por 51 aminoácidos cuya estructura es similar a *insuline-like growth factors 1 y 2* (IGF-1, IGF-2). La insulina cuando es codificada debe ser procesada para ser activa. Así, el gen de la insulina codifica para la pre-proinsulina que está formada por: una secuencia señal constituida por aproximadamente 23 aminoácidos, la cadena B unida a la cadena C y ésta a la cadena A (Nussey, 2001). En la mayoría de las especies la cadena A, que contiene un puente disulfuro interno en las posiciones A7-A11, está formada por 21 aminoácidos y la cadena B por 30 (De Meyts, 2004).

El péptido señal tiene la función de dirigir la molécula al retículo endoplasmático, y es ahí donde se corta dicho péptido denominándose ahora la molécula proinsulina. Dichas cadenas A y B se encuentran unidos por puentes disulfuro que se forman entre los residuos de cisteína entre las posiciones A7-B7 y A20-B19 (De Meyts, 2004). La cadena C codifica el llamado péptido C, esencial para la formación dichos puentes disulfuro entre las cadenas A y B y es eliminado por el aparato de Golgi, formándose de esta manera la molécula de insulina activa. El péptido C es secretado junto con la insulina y se sabe que lleva a cabo funciones relacionadas con la regulación del flujo sanguíneo y la función renal (Nussey, 2001).



**Figura 1. Gen de la insulina: secuencia de RNA de la insulina y mRNA tras eliminar las secuencias intrónicas.** (Nussey, 2001)

Así, el gen de la insulina en mamíferos está exclusivamente expresado en las células  $\beta$  del páncreas endocrino y la expresión específica en este tipo de tejido se debe a una secuencia de pocas pares de bases localizada en el extremo 5' (German *et al.*, 1995; Melloul *et al.*, 2002).

Las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos almacenan insulina en gránulos secretores, que son liberados por exocitosis. Dicha secreción es modulada por diversos factores incluyendo nutrientes, neurotransmisores y hormonas peptídicas (Torres *et al.*, 2009). Los estímulos metabólicos más potentes para la secreción de insulina son glucosa y aminoácidos. En cambio,

los triglicéridos y los ácidos grasos tienen un pequeño efecto sobre la liberación de insulina (Nussey, 2001).

Una vez liberada la insulina se dirige a sus principales dianas: hígado, tejido adiposo y músculo. Las células de dichos órganos presentan el receptor de insulina (IR). En el hígado, la insulina promueve la síntesis de glucógeno mediante la estimulación de la glucógeno sintetasa aunque en este órgano la insulina no tiene efecto directo sobre la toma de glucosa (Nussey, 2001). En las otras diana (músculo y tejido adiposo) la insulina induce una rápida absorción de glucosa al reclutar transportadores intracelulares de GLUT 4 (principal transportador de glucosa estimulado por insulina) y, por lo tanto, aumentar su expresión en la superficie celular. Como consecuencia, en el músculo se convierte la glucosa en glucógeno y en el tejido adiposo en ácidos grasos (Epstein *et al.*, 1999).

Además de su acción sobre la glucosa, la insulina promueve la absorción de aminoácidos (especialmente los aminoácidos esenciales leucina, valina, isoleucina y fenilalanina) en el músculo y estimula la síntesis de proteínas. Simultáneamente, evita la descomposición de proteínas y la liberación de ciertos aminoácidos en dicho tejido. (Nussey, 2001)

### **1.3 RECEPTOR DE INSULINA (IR) Y FAMILIA DE PROTEÍNAS IRS.**

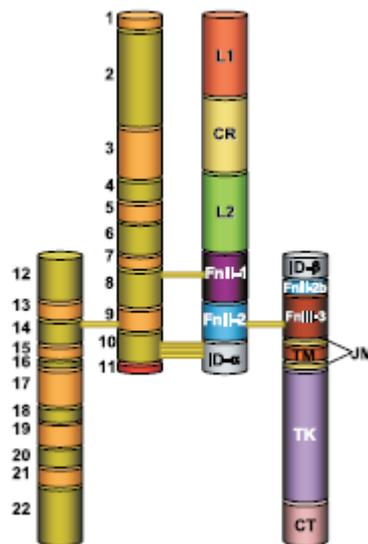
#### **1.3.1 Receptor de insulina**

El gen del receptor de insulina en humanos está codificado por 22 exones con una longitud de 120 kb localizado en el cromosoma 19. Al caracterizar el gen se observó que había dos isoformas distintas que se diferenciaban en el exón 11, que codifica una secuencia de 12 aminoácidos: la isoforma A (IR-A) que no contiene el exón 11 y la isoforma B (IR-B) que sí que lo contiene. Así, la diferencia entre ambas isoformas reside en el extremo C-terminal de una de las subunidades que forman la estructura del receptor, en concreto la subunidad  $\alpha$  (Ebina *et al.*, 1985; Ullrich *et al.*, 1985).

El receptor de insulina forma parte de una familia de receptores tirosin quinasa a la cual también pertenece el receptor de IGF-1 (IGF-1R) (Hedo *et al.* 1983). La proteína IR es un heterotetrámero constituido por dos subunidades  $\alpha$  extracelulares y dos subunidades  $\beta$  transmembranales unidas entre sí por enlaces disulfuro. La insulina se une a la subunidad  $\alpha$  estimulando la actividad tirosin quinasa de la subunidad  $\beta$ .

Además, el receptor de insulina está formado por unidades estructurales repetidas (Figura 2). El extremo N-terminal de cada monómero (subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  unidas) consta de dos dominios homólogos ricos en leucina (L1 y L2) de aproximadamente 150 aminoácidos cada uno, separados por una región rica en cisteína (CR) que consta de 7 repeticiones más pequeñas, que también contienen aproximadamente 150 residuos, con uno o dos enlaces disulfuro. El extremo C-terminal de cada monómero consta de 3 dominios de fibronectina tipo III (FnIII-1, FnIII-2 y FnIII-3), que son relativamente pequeños (aproximadamente 100 aminoácidos). El dominio FnIII-2 tiene un fragmento de 120 aminoácidos llamado dominio de inserción (ID). La parte intracelular de cada monómero contiene dominios tirosin quinasa (TK) flanqueados por

regiones reguladoras que contienen los sitios de unión de fosfotirosinas para la señalización de moléculas (De Meyts, 2008; Lawrence *et al.*, 2007). En concreto, estas regiones participan en el reclutamiento de los sustratos IR (IRS) (Cheng *et al.*, 2006).



**Figura 2. Estructura del receptor de insulina.** A la izquierda se representan los 22 exones que codifican las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ . A la derecha se representan los distintos módulos que forman la proteína: L1, "Large domain 1"; CR, "cysteine-rich domain"; L2, "large domain 2"; Fn, "fibronectin type III domains"; TM, "transmembrane domain"; JM, "juxta membrane domain"; TK, "tyrosine kinase domain"; CT, "C-terminal domain" (Belfiore *et al.*, 2009).

En cuanto a la expresión del IR, aunque los principales tejidos diana de la insulina son el hígado, el tejido adiposo y el músculo esquelético, también se ha encontrado el IR en otras partes del organismo como el cerebro, corazón, riñón, alvéolos pulmonares, acinos pancreáticos, endotelio vascular placentario, monocitos, granulocitos, eritrocitos y fibroblastos (Kaplan, 1984). El tejido adiposo es donde más se expresa (Belfiore *et al.*, 2009) y la expresión relativa del IR en el tejido hepático, cardíaco y pulmonar es de aproximadamente el 30% de la del tejido adiposo, mientras que en el músculo, el cerebro, el bazo, la placenta y el tejido renal de aproximadamente el 10% (Baillyes *et al.*, 1997). El IR no solo está restringido a los tejidos diana relacionados con la función metabólica de la insulina, por lo que también puede estar implicado en funciones no metabólicas (Belfiore *et al.*, 2009).

### 1.3.2 Familia de proteínas IRS

La insulina (y también IGF-1) se une a sus receptores de la superficie celular promoviendo la autofosforilación de una determinada región de la subunidad  $\beta$  del receptor, activándose así y llevando a cabo su acción tirosin kinasa (White *et al.*, 1985). El receptor activado fosforila diversas proteínas celulares, incluyendo los miembros de la familia de proteína IRS (sustratos de receptor de insulina) (Burks and White, 2001).

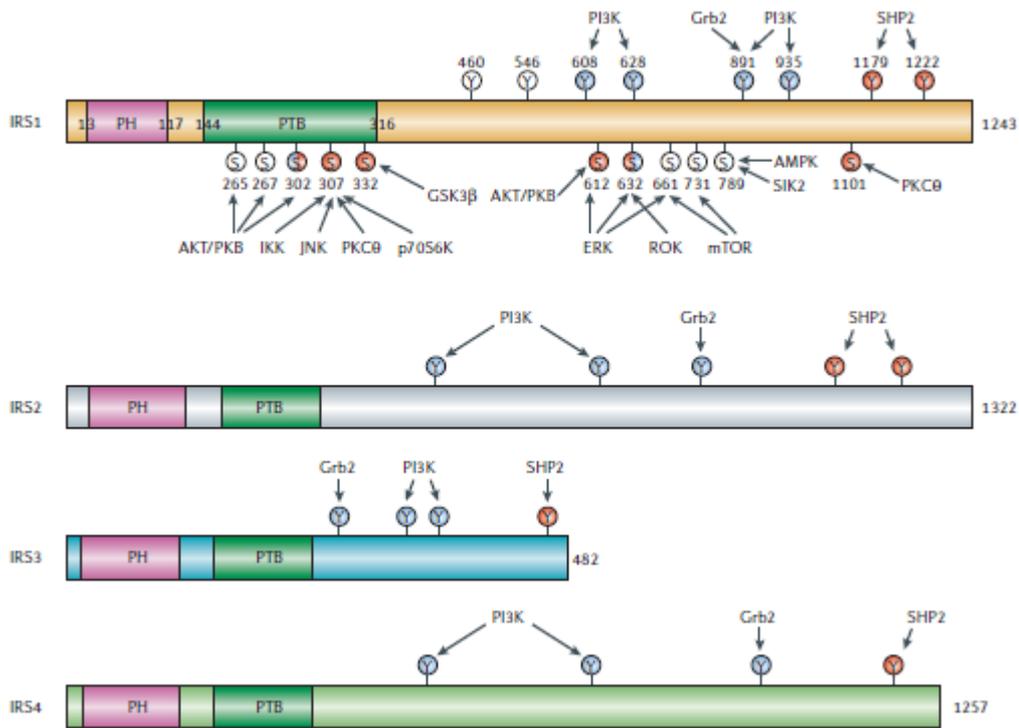
Las proteínas IRS están implicadas en la activación de dos rutas de señalización: la vía PI3K-AKT/PKB (*protein kinase B*), responsable de la mayoría de las acciones metabólicas de la insulina, y la vía Ras-*mitogen-activated protein kinase* (MAPK) que regula la expresión de genes

y junto con la vía de PI3K controla el crecimiento y diferenciación celular (Taniguchi *et al.*, 2006).

Existen varios tipos de IRS: IRS-1 se expresa de forma ubicua. IRS-2 se identificó inicialmente como un componente de la vía de señalización de la interleucina-4, pero ahora se sabe que se expresa en casi todas las células y tejidos (Sun *et al.*, 1995); IRS-3 se expresa predominantemente en tejido adiposo y cerebro (Cai *et al.*, 2003; Lane, 1997); IRS-4 se expresa en ratón principalmente en pituitaria, timo y cerebro (Fantin *et al.*, 1999). Se pueden incluir dentro de esta familia dos miembros más: IRS5 e IRS6 pero presentan una expresión, función y señalización muy limitada (Cai *et al.*, 2003)

En cuanto a la estructura, las proteínas IRS están formadas por 2 dominios (Figura 3): PH (*pleckstrin-homology*) y PTB (*phosphotyrosine-binding*). Ambos se encuentran en el extremo N-terminal y tienen gran afinidad por el IR, por lo que permiten que las IRS sean reclutadas en el IR para ser fosforiladas (Wu *et al.*, 2008). El centro y extremo C-terminal de estas proteínas está formado por residuos de tirosina que actúan como sitio de fosforilación, que tras fosforilarse las IRS por IR, se unirán a dichos sitios moléculas intracelulares que contengan dominios SH2 (*Src-homology-2*) (Lavin *et al.*, 2016). Entre estas moléculas destacan la subunidad reguladora de PI3K, Grb2, SHP2 (*SH2-domain-containing tyrosine phosphatase-2*) y tirosin kinasas citoplasmáticas como Fyn (Taniguchi *et al.*, 2006). Los productos de PI3K activan una red de serina-treonina quinasas implicada en la acción de la insulina en el transporte de glucosa, síntesis de glucógeno, síntesis de proteínas, antilipolisis y el control de la gluconeogénesis hepática (Shepherd *et al.*, 1998). Por lo tanto, la red de señalización de las proteínas IRS median los efectos pleiotrópicos de la insulina y el IGF-1 sobre la función celular (Burks and White, 2001).

Además, las IRS también pueden ser fosforiladas en residuos de Serina (Ser) o Treonina (Thr), y la mayoría de estudios concluyen que ello conlleva a una disminución de la expresión de estas proteínas y como consecuencia a la represión de la señalización por insulina (Lavin *et al.*, 2016).



**Figura 3. Estructura de las proteínas IRS.** Se muestran sus dominios PH (pleckstrin-homology) y PTB (phosphotyrosine-binding) y los residuos de tirosina (Y) que sirven como sitios de fosforilación de moléculas (Taniguchi et al., 2006).

En concreto en el caso de IRS2 aparece una región en su estructura que no está presente en los otros miembros de la familia IRS, la denominada KRLB (*kinase regulatory-loop binding*) o también RBD2 (*region or receptor binding domain 2*) (Sawka-Verhelle et al., 1996) que interacciona con el dominio tirosin kinasa del IR.

## 1.4 RELACIÓN DE LA DIABETES CON LAS PROTEÍNAS IRS

Se sabe que la hiperinsulinemia disminuye la expresión de IRS1 e IRS2 en modelos de cultivo celular y en los tejidos de ratones. Esto se debe a que la hiperinsulinemia induce la degradación de la proteína IRS1 e inhibe la síntesis de IRS2 a nivel transcripcional (Hirashima, 2003). Además algunos estudios han demostrado que unas proteínas llamadas SOCS podrían inducir la degradación de IRS1 e IRS2 mediada por la ubiquitina. Así, la disminución de los niveles de las proteínas IRS, junto con la disminución de los niveles del propio IR, contribuyen a la resistencia a la insulina tanto en roedores como en seres humanos (Shimomura, 2000).

### 1.4.1 IRS2

Estudios anteriores afirman que al eliminar el gen de IRS2 aparece un fenotipo diabético. Los ratones *knockout* (KO) para IRS2 presentan resistencia periférica a insulina y pérdida de función de las células  $\beta$  pancreáticas caracterizada por una pérdida del 50% de la masa de las células  $\beta$  debido a que IRS2 protege frente a la apoptosis (Burks and White, 2001). De forma distinta, al eliminar IRS1 aumenta la masa de las células  $\beta$  (Burks and White, 2001), por lo que

no se desarrolla diabetes porque aumenta la secreción de insulina para compensar la resistencia a insulina, es decir, la señalización por insulina es normal aparentemente debido a la acción de IRS2 (Araki *et al.*, 1994; Burks and White, 2001; Tamemoto *et al.*, 1994).

Estudios realizados revelan que la delección de IRS2 en ratones producía resistencia periférica a insulina y una secreción compensatoria de insulina inadecuada debido a fallos en las células  $\beta$ . Así, dichos ratones presentan una leve resistencia periférica a la insulina y una deficiencia de células  $\beta$  al nacer, pero tienen una secreción compensatoria adecuada de insulina durante varias semanas. Sin embargo, continuados fallos en las células  $\beta$  para reducir la resistencia a insulina causan hiperglicemia sin cetoacidosis, principal característica de la diabetes tipo 2 (Withers *et al.*, 1998).

Al examinar parámetros de señalización en tejidos de ratones de genotipo IRS2<sup>-/-</sup> se observó que la actividad de PI3K estaba alterada pudiendo ser esta la explicación de la resistencia a la insulina que presentan estos animales. Además, IRS1 no tiene capacidad suficiente para regular la actividad de PI3K en ausencia de IRS2 (Burks and White, 2001), demostrándose así la implicación de IRS2 en el desarrollo de la diabetes tipo 2.

Por otra parte, la ausencia de receptores de insulina reducen la fosforilación de IRS2 pero no la de IRS1, y la falta de activación de IRS2 está asociada con la disminución en la acción de la insulina (Rother *et al.*, 1998). Todo ello confirma que IRS2 actúa como el principal regulador de las acciones metabólicas de la insulina actuando sobre PI3K (Burks and White, 2001).

### **1.5 IRS2 Y SU IMPLICACIÓN EN EL CEREBRO. DIABETES TIPO 3.**

Se ha estudiado que los ratones hembra *knockout* para IRS2 son infértiles y muestran una mayor ingesta de alimentos y una leve obesidad, lo que sugiere que la señalización por IRS2 también promueve el control hipotalámico del apetito y la reproducción (Burks *et al.*, 2000). Además, la diabetes está asociada con el aumento de la incidencia de la enfermedad del Alzheimer, sugiriendo que fallos durante la señalización de insulina pueden provocar demencia (Frolich *et al.*, 1999).

Es común la utilización del término de diabetes tipo 3 para referirse a las implicaciones de la insulina y sus rutas de señalización en el sistema nervioso central (SNC) cuyos defectos producen neurodegeneración y la aparición de patologías cerebrales como puede ser el Alzheimer (Steen *et al.*, 2005).

El receptor de insulina y de IGF-1 junto con otros componentes de estas vías de señalización se expresan en todo el cerebro de mamíferos. Los IR cerebrales y la insulina están presentes en el hipotálamo, la corteza cerebral, bulbo, el cerebelo, el hipocampo y el lóbulo intermedio de la pituitaria (Raizada *et al.*, 1988; Van der Heide *et al.*, 2006). La hiperinsulinemia característica de la diabetes tipo 2 disminuye el transporte de insulina al cerebro mediado por IR (Watson and Craft, 2006). Además, en los pacientes con Alzheimer, la actividad cerebral de IR se reduce y las concentraciones de insulina en el líquido cefalorraquídeo son inferiores a lo normal, lo que indica un transporte de insulina dañado al cerebro (Plum *et al.*, 2005).

Las proteínas IRS que se expresan en el cerebro tanto en neuronas como en glía son IRS1, 2 y 4. Así, algunas rutas reguladas por IRS afectan a miembros del Sistema Nervioso Central (SNC) como por ejemplo la vía PI3K-Akt (Saltiel, 2001), cuya activación promueve el crecimiento y supervivencia neuronal mediante la fosforilación de ciertos factores de transcripción que regulan la expresión génica y fosforilación de proteínas como BAD (*Bcl-2-associated death*) para inhibir la apoptosis (Brunet *et al.*, 1999; Rodgers and Theibert, 2002). La activación de PI3K promueve la transmisión GABAérgica en las neuronas piramidales corticales prefrontales que juegan un papel clave en el aprendizaje y la memoria (Ma *et al.*, 2003) y Akt bloquea la acumulación de placas  $\beta$ -amiloides asociadas con la enfermedad de Alzheimer (Kaytor and Orr, 2002).

La enfermedad del Alzheimer está caracterizada por una pérdida progresiva de memoria, alteraciones en el habla y en el comportamiento. Dicha enfermedad se debe a la acumulación de depósitos extracelulares del péptido  $\beta$ -amiloide que promueve la inflamación y la acumulación intracelular de neurofibrillas compuestas de filamentos helicoidales que se unen debido a la hiperfosforilación de la proteína tau, que está asociada a los microtubulos (Hardy and Selkoe, 2002; Lucas *et al.*, 2001; Selkoe, 2001). La fosforilación de tau puede ser una consecuencia directa de desórdenes en la señalización insulina-IGF que ocurre durante el envejecimiento. Diversos estudios sugieren que la diabetes tipo 2 y la resistencia a insulina aumentan el riesgo de deterioro cognitivo con la edad (Carantoni *et al.*, 2000; Finch and Cohen, 1997).

La proteína IRS2 tiene importantes funciones durante la señalización en el cerebro ya que su acción promueve la proliferación neuronal que aumenta el tamaño del cerebro y también permite la desfosforilación de la proteína tau. Dicha proteína tau es una proteína neuronal asociada a los microtúbulos que se encuentra en el axón promoviendo la polimerización de tubulina y estabiliza a los microtúbulos. La eliminación de IRS2 promueve la fosforilación de tau, por lo que ello puede ser un link entre este marcador de neurodegeneración y la resistencia periférica a insulina o diabetes (Schubert *et al.*, 2003).

## 1.6 ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo aparece cuando se producen desequilibrios entre la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y el sistema de defensa antioxidativo. Dicho estrés aparece en muchas enfermedades como por ejemplo en diabetes, enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson), cáncer, etc. (Buendia *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2012). El daño oxidativo aparece pronto en las enfermedades sugiriendo que juega un papel importante en la progresión de la enfermedad (Ramsey *et al.*, 2007).

En respuesta al estrés oxidativo, las células tienen diferentes sistemas de defensa para regular el daño derivado. Los genes cuyos productos participan en la regulación del estrés oxidativo, así como en la inflamación y en la acumulación de metabolitos tóxicos contienen un elemento promotor común llamado elemento de respuesta antioxidante (ARE, *Antioxidant Response Element*) (Ramsey *et al.*, 2007). La respuesta antioxidante de fase II se considera la vía de

defensa más importante presente en las células. Está regulado por la transcripción del factor Nrf2, *nuclear factor E2-related factor 2*. Nrf2 juega un papel muy importante frente al estrés oxidativo e induce la expresión de un gran número de genes citoprotectores y detoxificadores (Figura 4) (Buendia *et al.*, 2016).

En condiciones normales Nrf2 se encuentra en el citoplasma, donde interacciona con Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein-1*) y es rápidamente eliminado por el proteasoma. Pero cuando las células sufren estrés oxidativo, las ROS actúan sobre Keap1 provocándole un cambio conformacional y su separación de Nrf2 que se trasloca al núcleo donde se une al ARE y promueve la expresión de genes que codifican proteínas antioxidantes que combaten el estrés oxidativo como, entre otros (Buendia *et al.*, 2016; Zhang, 2006):

- NQO1 (NAD(P)H quinone oxidoreductase-1),
- GST (glutathione S-transferase), GST's microsomales (mGST1 and mGST2),
- HO-1 (heme oxygenase-1)

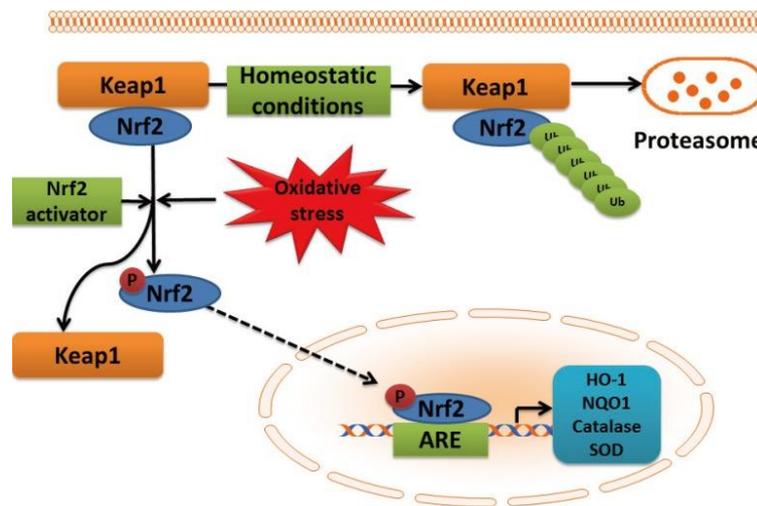


Figura 4. Vía de señalización de Nrf2 estimulada por el estrés oxidativo (Chen *et al.*, 2014).

Además, Nrf2 también contiene una secuencia de exportación nuclear para eliminar Nrf2 del núcleo cuando la respuesta antioxidante ya no sea necesaria (Jain *et al.*, 2017).

Otro marcador importante para combatir el estrés oxidativo es p62, también llamado SQSTM1 (*sequestosome 1*). p62 es un marcador típico de autofagia que está implicado en la degradación proteasomal de las proteínas ubiquitinadas. Cuando se altera el nivel de p62 celular, la cantidad y la localización de las proteínas ubiquitinadas cambian afectando a la supervivencia de las células. Además, la transcripción de p62 es también modulada por el estrés oxidativo, por la vía de señalización de Nrf2 (Liu *et al.*, 2016).

Neuronas y astrocitos dependen de la activación de la vía de señalización de Nrf2 para protegerse de la muerte por estrés oxidativo (Ramsey *et al.*, 2007). Los niveles de estos genes aumentan para combatir el estrés. Así ocurre cuando los pacientes sufren diabetes y enfermedades neurodegenerativas.

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La hipótesis de la que se parte en este trabajo consiste en que los ratones deficientes en IRS2 presentarán variación en la expresión en genes que actúan frente al estrés oxidativo y se alterará la expresión de genes en el cerebro partiendo de los resultados obtenidos en un estudio previo por microarrays.

Los objetivos del presente estudio se basan en:

- Analizar la expresión por Real-Time PCR de genes cuya expresión se observó que era distinta entre animales control y con eliminación de IRS2 tras realizar estudios por microarray.
- Analizar por Real-Time PCR las diferencias en la expresión de genes de la vía de señalización de Nrf2 entre ratones macho jóvenes, hembras jóvenes y adultas.
- Caracterizar la expresión de marcadores de la vía de señalización de Nrf2 sobre tejido cerebral mediante técnicas inmunohistoquímicas.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 MODELO ANIMAL

El modelo animal que se utilizó fueron ratones *wild type* (WT) y *knockout* (KO) para el gen IRS2, en concreto la cepa C57/Black 6.

Los ratones KO para IRS2 son un 10% más pequeños que los heterocigotos y WT. Los ratones macho IRS2<sup>-/-</sup> presentan polidipsia y poliuria sin cetosis, y mueren de deshidratación y coma hiperosmolar (Withers *et al.*, 1998). Los ratones hembras siguen una progresión de la enfermedad similar, pero más lenta quizás debido a una protección hormonal (Burks *et al.*, 2000). Por lo tanto, la delección de IRS2 deteriora progresivamente la tolerancia a la glucosa con más del 95% de penetrancia, mientras que los animales heterocigotos y de tipo salvaje no se ven afectados (Withers *et al.*, 1998).

La eliminación de IRS2 en ratones provoca un fenotipo diabético caracterizado por machos obesos y hembras obesas e infértiles. En todos los casos se observa un cerebro de tamaño reducido, con una disminución del 50% en la proliferación neuronal y un aumento en la hiperfosforilación de la proteína Tau, marcador de neurodegeneración.

Se consideran animales diabéticos si sus niveles de glucosa en sangre son superiores a 150 mg/dL. Valores entre 70-80 mg/dL se consideran normales. Así, los ratones IRS2<sup>-/-</sup> jóvenes también se denominan normoglicémicos (KON) ya que generalmente sus niveles de glucosa son normales y los ratones IRS2<sup>-/-</sup> adultos se denominan diabéticos (KOD) al presentar niveles alterados de glucosa en sangre.

Para obtener los valores de glucosa en sangre de los animales se mantuvieron en ayunas 8-10 horas antes de realizar la lectura. Se utilizaron tiras reactivas de glucosa en sangre (Contour NEXT, Bayer, Barcelona, España) sobre las cuales se depositaba una gota de sangre del animal y se introdujo en el medidor de glucosa Contour XT (Bayer, Barcelona, España).

## **3.2 OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE TEJIDO**

Todos los procedimientos llevados a cabo se realizaron cumpliendo las normas del Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA).

Se obtuvieron muestras de cerebro de los ratones tanto WT como KO para IRS2. Para ello los animales se dejaron en ayunas unas 8-10 horas antes y se sacrificaron por decapitación. A continuación, se retiró el cerebro en su totalidad y se partió en distintos trozos en función del experimento que se llevase a cabo. Una vez obtenidos los fragmentos se congelaron en nitrógeno líquido para posteriormente guardarlos a -80 °C.

## **3.3 ESTUDIO DE EXPRESIÓN GÉNICA**

### **3.3.1 Extracción de RNA a partir de las muestras de tejido**

Los fragmentos de cerebro obtenidos de los ratones se introdujeron en 1 mL de Trizol y se homogeneizaron en Polytron PT1600E (KINEMATICA AG, Switzerland). A continuación, se siguió el protocolo de extracción de TRIzol® Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) siguiendo las especificaciones del fabricante.

#### **3.3.1.1 Determinación de la concentración y calidad del RNA**

La cantidad total de RNA junto con su calidad se cuantificó utilizando el NanoDrop ND-1000 *spectrophotometer* (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

Para ello se realizaron lecturas de absorbancia (A) de las muestras a distintas longitudes de onda ( $\lambda$ ); a 280 nm ( $\lambda$  de máxima absorción de proteínas y fenol), a 260 nm ( $\lambda$  de máxima absorción de RNA y DNA) y a 230 nm ( $\lambda$  máxima de absorción de sales minerales). En concreto se obtuvieron los valores A 260/280, A 260/230 y valores de concentración en ng/ $\mu$ L.

#### **3.3.1.2 Tratamiento con DNasas y purificación**

El RNA obtenido se preparó para tener una concentración final de 30  $\mu$ g en un volumen de 100  $\mu$ L para llevar a cabo el tratamiento con 10  $\mu$ L de DNasa I (RNase-free DNase set, QIAGEN, Hilden, Germany) y purificación utilizando RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

### **3.3.2 Obtención de cDNA por retrotranscripción**

Para obtener cDNA se partió de 3  $\mu$ g de RNA diluido en 20  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O *RNase-free* y se utilizó el kit RNA to cDNA EcoDry Premix (Doubled Primed) (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA) que contiene la retrotranscriptasa y los componentes necesarios para llevar a cabo la retrotranscripción en el termociclador, según los parámetros recogidos en la Tabla 1:

Retrotranscripción		
42 °C	60 minutos	Activación retrotranscriptasa
70 °C	10 minutos	Inactivación del enzima
4°C		El producto se mantuvo a dicha Tª hasta que se retiró del termociclador.

**Tabla 1. Condiciones de la reacción de retrotranscripción.** Parámetros de temperatura (°C) y tiempo (minutos) que se utilizaron para llevar a cabo la obtención de cDNA a partir de RNA por retrotranscripción.

### 3.3.3 Análisis de expresión

#### 3.3.3.1 Cebadores utilizados:

Los cebadores utilizados para el análisis de expresión se recogen en las Tablas 2 y 3:

- *Primers* de genes diferencialmente expresados entre el cerebro de ratones WT y KO para IRS2:

GEN	Nº identificación	PRIMER FORWARD	PRIMER REVERSE
Sdc4	NM_011521.2	5'-GTCCTGTT TTTGACCTTGG-3'	5'-CCGCTATCC CCCTACATTAT-3'
Sgne1	NM_009162	5'-TCTTCAG CATCTGGGTCCTT-3'	5'-TGGGTAG CCTTGATCCTCAC-3'
Dctn4	NM_026302.3	5'-AGGAGTG GCTGTCCTCAGA-3'	5'-AGGTGTG CTCTGGATTACCG-3'
Atm	NM_007499.2	5'-TCAGAAG GTGCTGTGAAAA-3'	5'-CCAATCA AAGAGTGGATCGT-3'
Nte	AF173829.1	5'- CCGTGGTGAAGTCATT GAGA-3'	5'- TGAACCCAGAACTTGG GAAG-3'
Gjb2	NM_008125.2	5'-GCCTACC GGAGACATGAAAA-3'	5'-CCTTCGA TACGGACCTTCTG-3'
Mapre1	NM_007896.3	5'-AAGGGTG ATGCGACTACCAC-3'	5'-AAACACA CCCCAAGTTCTGC-3'
Phgdh	NM_016966.3	5'-CAGAACT GAACGGGAAGACA-3'	5'-TGATGGG GTCATAGCCTACA-3'
Gmfb	NM_022023.1	5'-CAACTGT GTGCTCACTAGCC-3'	5'-TCTTGCTC TCTGGACACTGA-3'
Cplx2	NM_009946.2	5'-CACCAGG GAGAGAGACCTGA-3'	5'-CCCTACA TGAGCAGGATGGT-3'

Bcat2	NM_009737.1	5'-ATGAAGG CAAGCAACTCCAC-3'	5'-GCACTGG CTCCGTAATGAAT-3'
Nckap1	NM_016965.2	5'-ACCACATT CCTTTCCTCGTG-3'	5'-CCGAGGA CAGTCCATACACA-3'
Ccng1	NM_009831.2	5'-GGCTTTG ACACGGAGACATT-3'	5'-TCAGTCC AACACACCCAAGA-3'
Gpr88	NM_022427.1	5'-TCGTGAG TTGCCACTGAGAC-3'	5'-TGTTTCCT CACTGGCTGAGA-3'
Fgfr1	AK005320.1	5'-TCTTCAT CGAGCAGACCAC-3'	5'-GCCGATG TCTTGCTACTTCA-3'
Commd9	NM_029635.1	5'-CCTGCTC CAGATGAAGATCC-3'	5'-ATGGTGT CCAGCGTCTCTTT-3'
Gapdh	NM_008084	5'-TGCACCA CCAAGTCTTAGC-3'	5'-TCTTCTG GGTGGCAGTGATG-3'

**Tabla 2. Lista de cebadores de genes cuya expresión es diferencial entre ratones WT y KO para IRS2. Se muestran los cebadores directos (forward) e inversos (reverse) en la dirección 5' – 3'.**

- *Primers* de genes relacionados con la vía de señalización de Nrf2:

GEN	Nº identificación	PRIMER FORWARD	PRIMER REVERSE
Nrf2	NM_010902.4	5'-TCCAGAC AGACACCAGTGGA-3'	5'-GGAATGT CTCTGCCAAAAGC-3'
Nqo1	NM_008706.5	5'-AGCGTTC GGTATTACGATCC-3'	5'-AGTACAA TCAGGGCTCTTCTCG-3'
p62	NM_011018.3	5'-GCTGCCC TATACCCACATCT-3'	5'-CGCCTTC ATCCGAGAAAC-3'
Gstm1	NM_010358.5	5'-CACAAGA TCACCCAGAGCAA-3'	5'-TGGTTCT CCACAATGTCTGC-3'
Ho-1	NM_010442.2	5'-GGTCAGG TGTCAGAGAAGG-3'	5'-CTTCCAG GGCCGTGTAGATA-3'
Gapdh	NM_008084	5'-TGCACCA CCAAGTCTTAGC-3'	5'-TCTTCTG GGTGGCAGTGATG-3'

**Tabla 3. Lista de primers de genes relacionados con la vía de señalización del factor de transcripción Nrf2 y la respuesta a estrés oxidativo. Se muestran los primers directos (forward) e inversos (reverse) en la dirección 5' – 3'.**

### 3.3.3.2 PCR cuantitativa (Real-Time PCR)

Las Real-Time PCR se realizaron en placas de 96 y de 384 pocillos de acuerdo a las siguientes especificaciones:

Para las placas de 96 pocillos se cargó cada pocillo con 4,2  $\mu$ L de cDNA (1/125), 0,4  $\mu$ L de primer *forward* (10mM), 0,4  $\mu$ L de primer *reverse* (10mM) y 5  $\mu$ L de SYBR Premix ExTaq (Tli RNaseH Plus) (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA) que contiene dNTPs, polimerasa, tampón y el fluorocromo SYBR *Green*.

Para las placas de 384 pocillos la mezcla de reacción para cada pocillo se compuso de 5  $\mu$ L de cDNA (1/125), 0.1  $\mu$ L de primer *forward* y *reverse* (50mM) y 4'9  $\mu$ L de SYBR Premix ExTaq (Tli RNaseH Plus) (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA) que contenía dNTPs, polimerasa, tampón y el fluorocromo SYBR *Green*.

En todos los casos, las muestras se cargaron por triplicado y se utilizó como control positivo un calibrador con mezcla de cDNAs y como control negativo H<sub>2</sub>O *RNase-free*. Además se utilizó *Gapdh* (*Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*) como *house-keeping gene* en todas las Real-Time PCR que se llevaron a cabo.

Preparadas las placas se sellaron con film termo-adhesivos (Roche, Basilea, Suiza) y se introdujeron en el termociclador LightCycler 480 (Roche, Basilea, Suiza). La reacción tuvo lugar en las condiciones resumidas en la Tabla 4:

Proceso	Temperatura	Tiempo	
Desnaturalización	95 (°C)	5 minutos	
Amplificación	95 (°C)	15 segundos	45 ciclos
	54 (°C)	20 segundos	
	72 (°C)	20 segundos	
Curva de fusión	95-65-72 (°C)		
Enfriamiento	De 40°C a 4°C		

**Tabla 4. Condiciones de temperatura y tiempo en las que se llevaron a cabo las Real-Time PCR. Se diferencian los distintos procesos de desnaturalización del cDNA, amplificación, curva de fusión o “melting curve” y enfriamiento.**

### 3.3.3.3 Análisis de los datos

Se obtuvieron los valores Cp (*Crossing point*) para cada uno de los genes analizados por triplicado y se normalizó en función del valor Cp del gen que se utilizó como control interno, en este caso Gapdh. Para ello se aplicó la ecuación  $2^{(-\Delta Cp)} * 100$ , siendo  $\Delta Cp$  la diferencia de los valores Cp entre el gen en cuestión y Gapdh.

Para determinar si los datos obtenidos eran estadísticamente significativos se aplicó la ecuación estadística *t-student* considerándose estadísticamente significativos si el p-valor era  $\leq 0,05$ . Para ello se utilizó el programa estadístico Graphpad Prism 4 (Graphpad Software, Inc).

## 3.4 ENSAYOS DE INMUNOFLORESCENCIA SOBRE TEJIDO CEREBRAL

### 3.4.1 Inclusión de tejidos en OCT y obtención de cortes

Para llevar a cabo la inclusión de tejidos en OCT (*Optimal Cutting Temperature compound*) se obtuvieron cerebros de ratones macho jóvenes, en concreto 3 de cada grupo (WT y KO para IRS2). Dichos cerebros se trataron para poder incluirlos en OCT. Para ello se introdujeron en PFA (paraformaldehído) al 4% *overnight* y se realizaron lavados con PBS 1x. Tras los lavados se añadió sacarosa 10% y se dejó *overnight*. Así sucesivamente con sacarosa 20% y 30%. Transcurrido dicho tiempo los cerebros se cortaron coronalmente dividiéndose en dos partes, las cuales se introdujeron en pocillos que contenían OCT (Tissue-Tek O.C.T. Compound, Sakura Finetek, Países Bajos) orientados de forma que la zona por la que se había realizado el corte estuviera en contacto con la base del pocillo. Se cubrieron los pocillos con parafilm y se congelaron a  $-80^{\circ} \text{C}$ .

Se utilizó el criostato para obtener los cortes de tejido cerebral con un espesor de 6 micras.

### 3.4.2 Inmunohistoquímica

Los cortes de cerebro de ratones control y mutantes se permeabilizaron previamente a la incubación con anticuerpos. Para ello se añadió a cada uno de los cortes una solución de PBS-Tritón 100X 0,3% durante 30 minutos. A continuación se añadió la solución de bloqueo (10% *goat serum* en PBS-Tritón 100X 0,3%) durante 2 horas. Se añadieron los anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo y se incubaron *overnight* a  $4^{\circ} \text{C}$ . Los anticuerpos primarios utilizados (Tabla 5) fueron anti-Nrf2 (1:100, *rabbit*, ref. sc-722, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), anti-p62 (1:500, *rabbit*, ref. FM045, MBL international, Woburn, MA, USA), anti-Tuj1 (1:500, *mouse*, ref. T2200-200 UL, Sigma-Aldrich, San Luis, MO, USA) y anti-GFAP (1:500, *mouse*, ref. 63893-100 UL, Sigma-Aldrich, San Luis, MO, USA).

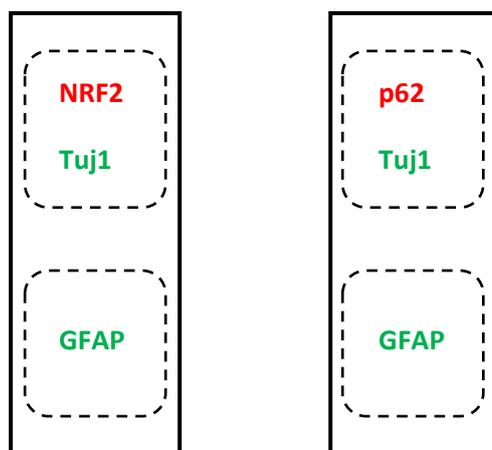
Antígeno	Organismo huésped	Dilución
Nrf2	Conejo	1:100
p62	Conejo	1:500
Tuj1	Ratón	1:500
GFAP	Ratón	1:500

**Tabla 5. Listado de anticuerpos que se utilizaron para llevar a cabo los ensayos de inmunofluorescencia.**

A continuación se realizaron una serie de lavados con PBS-Tritón 100X 0,3%. Finalmente, se añadieron los anticuerpos secundarios fluorescentes correspondientes: anti-*rabbit* (Alexa Fluor 568 *goat anti-rabbit* IgG, ref. A11011, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y anti-*mouse* (Alexa Fluor 488 *fragment of goat anti-mouse* IgG, ref. A11017, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) diluidos en solución de bloqueo y se incubaron durante 2 horas.

Sobre cada una de las preparaciones se añadió *Hoechst* (1:2000, ref. B2261-25MG, Sigma-Aldrich, San Luis, MO, USA) diluido en PBS-Tx 0,1% y se incubó durante 20 minutos. Para finalizar se realizaron una serie de lavados con PBS-Tx 0,1%.

En la Figura 5 se detallan los cortes de tejido cerebral y los anticuerpos incubados sobre cada uno de ellos, observándose en verde los correspondientes al anticuerpo secundario 488 (*mouse*) y en rojo los correspondientes al anticuerpo secundario 568 (*rabbit*):



**Figura 5. Distribución de los cortes cerebrales y los anticuerpos incubados sobre ellos.** En rojo aparecen aquellos anticuerpos cuyo secundario emite en la zona del espectro correspondiente al rojo y en verde aquellos cuyo anticuerpo secundario emite en la zona del espectro correspondiente al verde.

Cada uno de los portaobjetos se preparó por triplicado, es decir, cada uno de los portaobjetos de la Figura 5 se preparó 3 veces para animales control (WT) y 3 para animales con delección de IRS2 (KO).

Los análisis de las imágenes obtenidas se procesaron utilizando el programa ImageJ (Java).

### 3.4.3 Tinciones Hematoxilina/Eosina.

Se prepararon nuevos cortes de los cerebros del apartado 3.4.1. Dichos cortes se rehidrataron con xileno y etanol a distintas concentraciones. A continuación se llevó a cabo la tinción con hematoxilina durante 2 minutos. Pasado ese tiempo se realizaron lavados para finalmente teñir los cortes con eosina durante 30 segundos. Finalmente se deshidrataron con etanol y xileno.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 TAMAÑO CEREBRAL EN RATONES DEFICIENTES EN IRS2

La delección de IRS2 en ratones tiene un efecto sobre el tamaño del cerebro, ya que el cerebro anterior, el cerebelo y el tronco encefálico disminuyen su tamaño (Schubert *et al.*, 2003). Dicha diferencia de tamaño cerebral se observó al obtener las muestras de tejido entre animales WT y KO para IRS2, como se puede observar en la Figura 6:



**Figura 6. Diferencias en el tamaño cerebral.** Cerebros obtenidos de ratón macho WT (izquierda) y de KO (derecha) para IRS2. Se observa diferencia de tamaño entre ambos, siendo de menor tamaño el procedente de ratón con delección de IRS2.

El peso obtenido de los cerebros procedentes de animales WT fue de alrededor de 0,42 gramos mientras que el de los KO para IRS2 de 0,27 gramos.

### 4.2 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Para llevar a cabo el análisis de expresión de determinados genes en el cerebro de ratones se realizaron distintos ensayos recogidos en la Tabla 6:

Ensayo	Ratones	Edad
Genes diferencialmente expresados en cerebro	8 machos WT 8 machos KO	2-3 meses (jóvenes)
Genes vía señalización Nrf2	8 machos WT 8 machos KO	2-3 meses (jóvenes)
Genes vía señalización Nrf2	5 hembras WT 5 hembras KO	2-3 meses (jóvenes)
Genes vía señalización Nrf2	3 hembras KO	10 meses (adultas)

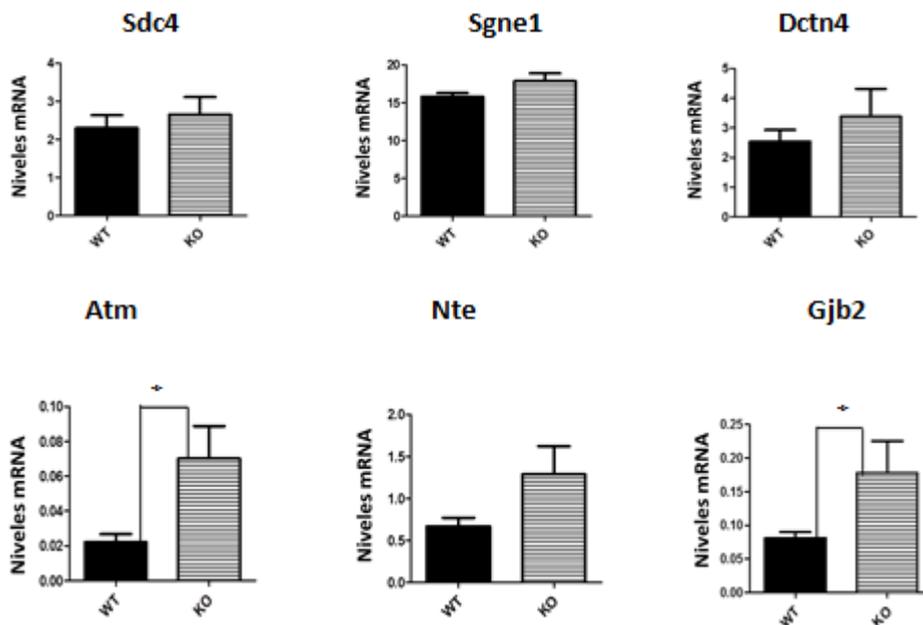
**Tabla 6. Ensayos de expresión génica.** Siendo WT animales salvajes y KO animales mutantes con delección del gen de IRS2. Los ratones jóvenes son normoglicémicos (valores normales de glucosa) y los adultos diabéticos.

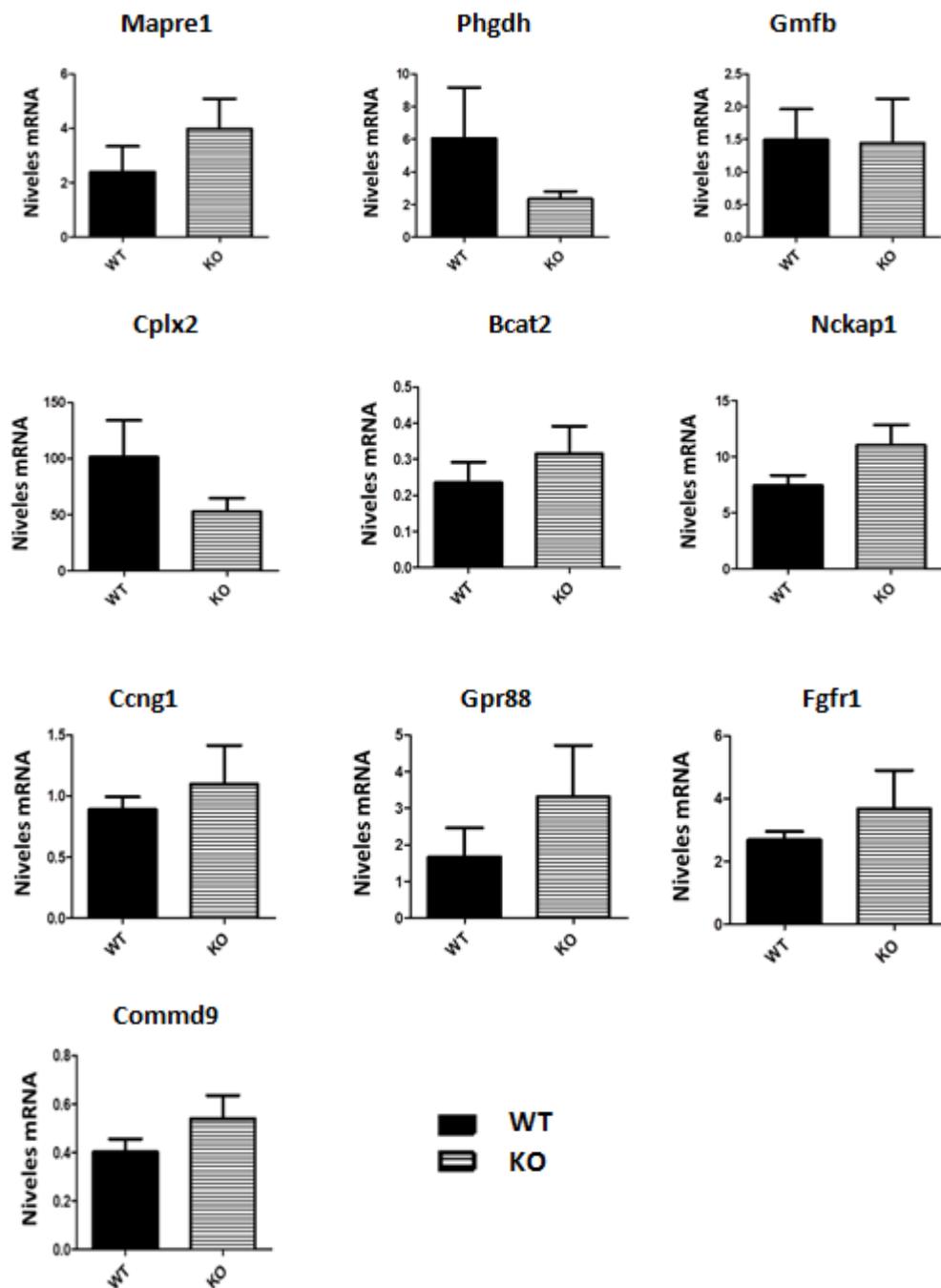
#### 4.2.1 Genes diferencialmente expresados en cerebro

Estudios anteriores llevaron a cabo estudios de expresión sobre cerebros de este modelo animal mediante microarrays observándose diferencias significativas entre algunos genes. En el presente trabajo se intentaron validar dichos resultados.

Así, se realizaron estudios de expresión de algunos de esos genes sobre ratones macho de 2-3 meses de edad (normoglicémicos) para observar si dichos marcadores también estaban implicados en la neurodegeneración de forma temprana.

Sobre 8 ratones macho jóvenes de genotipo silvestre y 8 ratones macho jóvenes de genotipo IRS2<sup>-/-</sup> se analizaron 16 genes del total de 25 genes diferencialmente expresados obtenidos del estudio por microarrays, obteniéndose los resultados detallados en la Figura 7:





**Figura 7. Representación gráfica de los niveles de mRNA de genes diferencialmente expresados en cerebro. Se compararon ratones WT (negro) y KO (rayas) para IRS2. Se analizó cDNA procedente de ratones macho de 2-3 meses de edad. \* p-value <0,05.**

Los niveles de expresión aumentan en los ratones de genotipo IRS2<sup>-/-</sup> en prácticamente todos los marcadores excepto para Cplx2 (*Complexin 2*) y Phgdh (*Phosphoglycerate Dehydrogenase*). En general existe una correlación entre estos resultados y los que se obtuvieron en el microarray. De todos los genes analizados, la diferencia entre WT y KO únicamente es significativa para los genes Atm (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) y Gjb2 (*Gap Junction Protein Beta 2*).

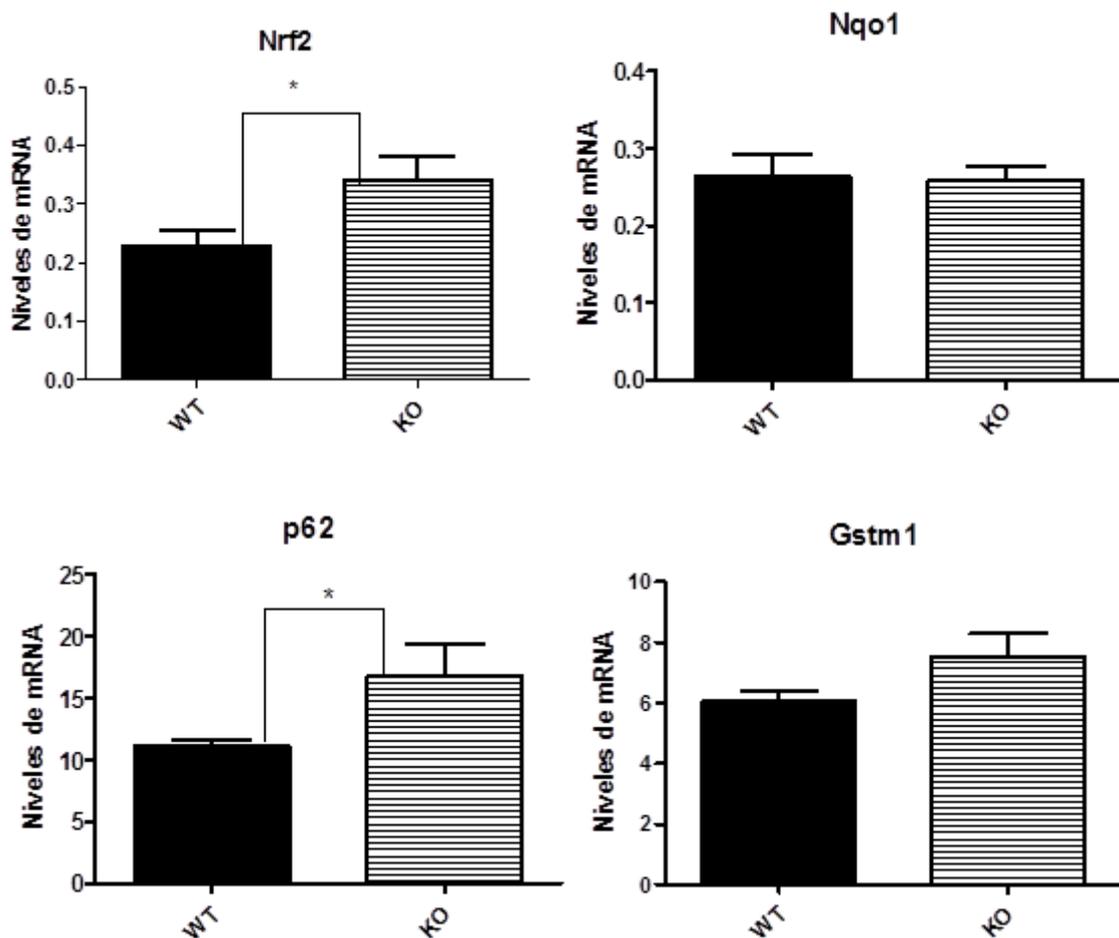
#### 4.2.2 Marcadores de la vía de señalización Nrf2

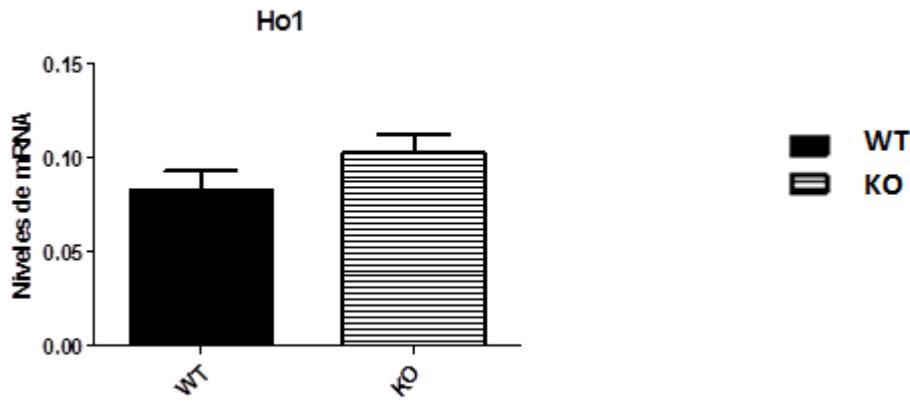
Cuando se sufre estrés oxidativo el factor de transcripción Nrf2 promueve la expresión de genes antioxidantes como son Nqo1, Gstm1 y Ho-1 entre otros. Junto con dichos marcadores también se analizó el marcador p62, cuya función está asociada a la autofagia y su expresión también está relacionada con la vía de señalización de Nrf2 (Buendia *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2016).

Así, se analizó la expresión de dichos marcadores en el cerebro para observar las diferencias existentes entre animales WT y KO para IRS2.

##### 4.2.2.1 Caracterización de genes antioxidantes en ratones machos

El cDNA obtenido de los ratones machos para el análisis de genes diferencialmente expresados en cerebro se utilizó para el análisis de estos marcadores antioxidantes. Así, obtenido el cDNA de ratones macho de 2-3 meses de edad tanto silvestres como mutantes para IRS2 (8 animales de cada grupo) se analizaron los marcadores, obteniéndose los resultados de la Figura 8:



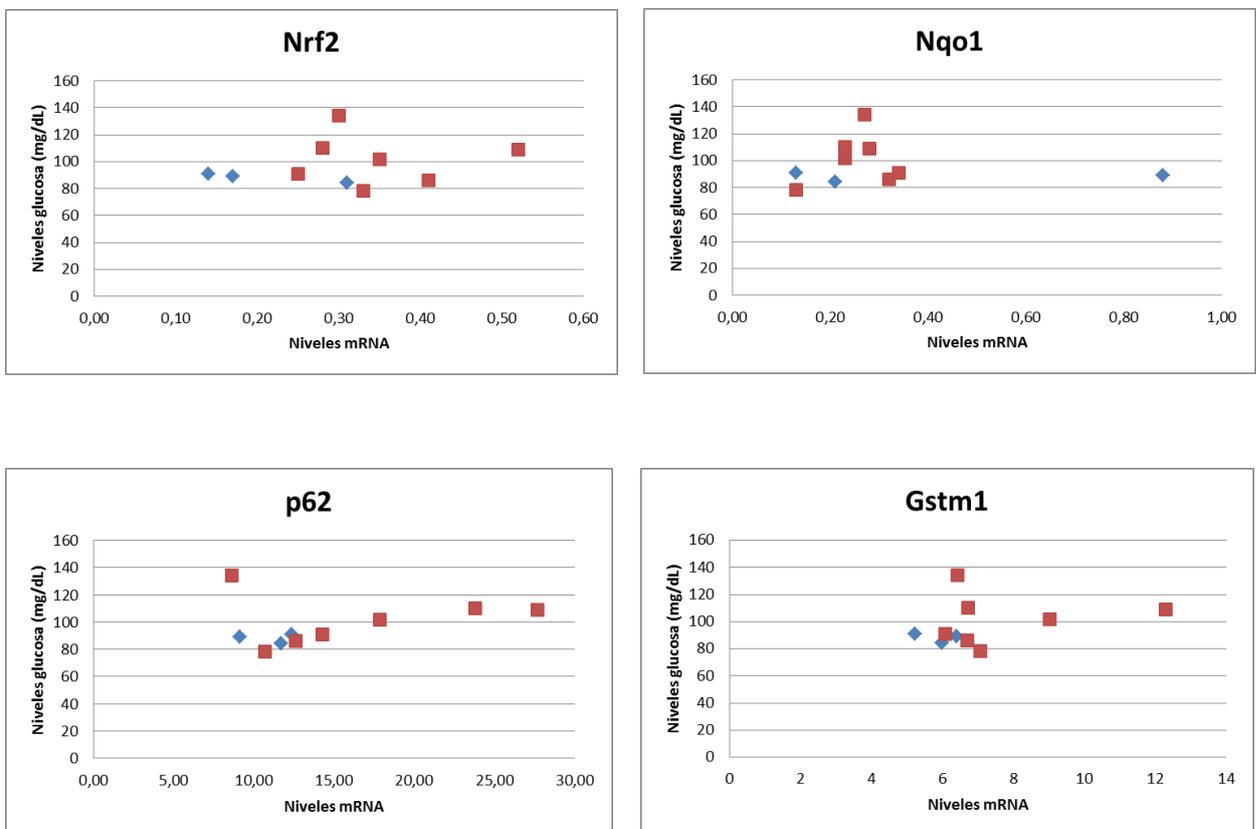


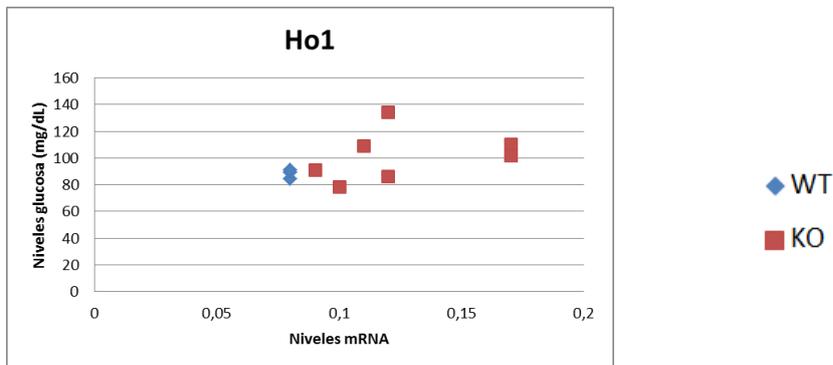
**Figura 8.** Representación gráfica de los niveles de mRNA de marcadores de la vía de señalización de Nrf2 en ratones macho jóvenes. Se analizan machos jóvenes wild type (WT) (negro) y knockout (KO) (rayas) para IRS2. \* *p*-value <0,05.

Todos estos marcadores se ven aumentados en los ratones IRS2<sup>-/-</sup> excepto Nqo1, cuyos niveles se mantienen prácticamente constantes. En concreto para los marcadores Nrf2 y p62 las diferencias entre silvestres y mutante son significativas.

#### 4.2.2.2 Relación niveles de expresión-niveles de glucosa

Los valores de expresión de los marcadores antioxidantes en los ratones macho jóvenes se relacionaron con sus niveles de glucosa, obteniéndose las relaciones de la Figura 9:





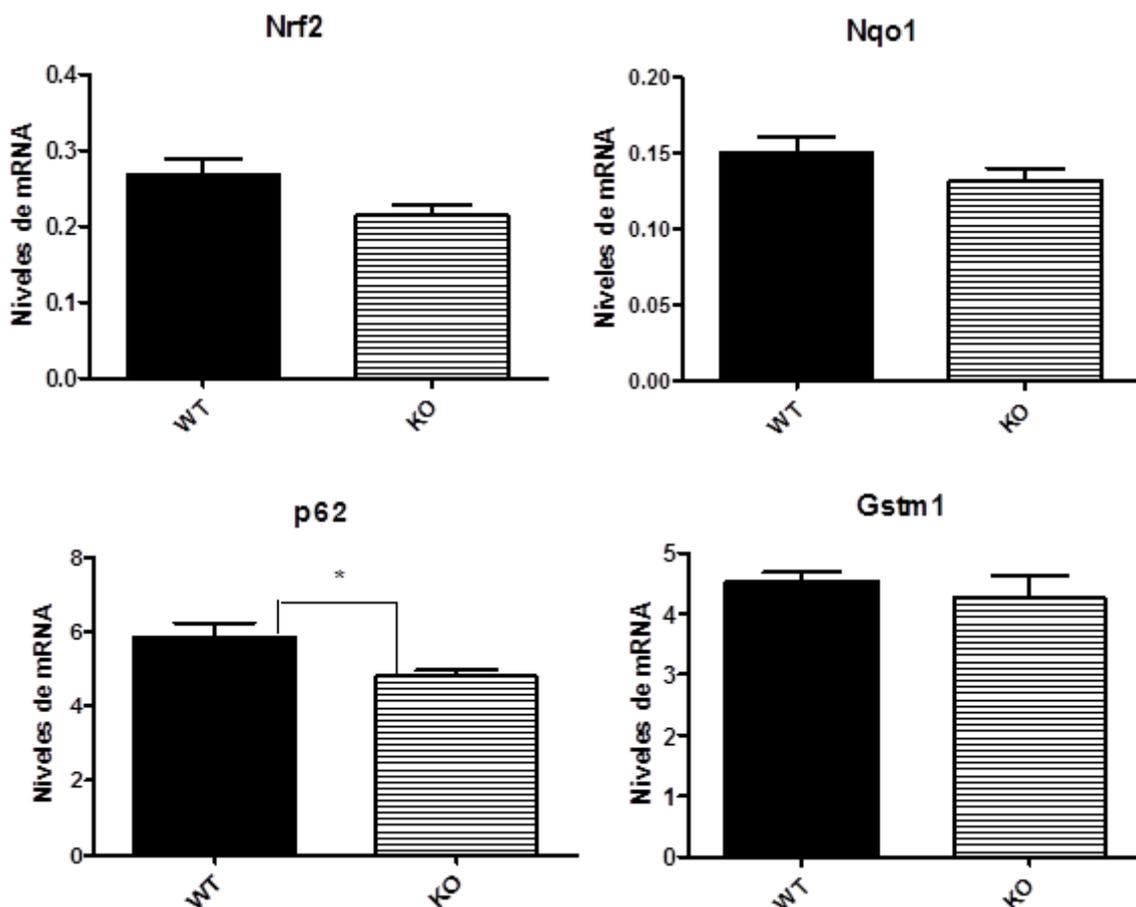
**Figura 9. Relación entre los niveles de mRNA de marcadores de la vía de señalización de Nrf2 con los niveles de glucosa.** Dichos niveles de glucosa se midieron en mg/dL en animales wild type (WT) (azul) y en knockout (KO) (rojo) para IRS2. Los datos se obtuvieron de 3 ratones macho WT jóvenes y 7 ratones macho KO jóvenes.

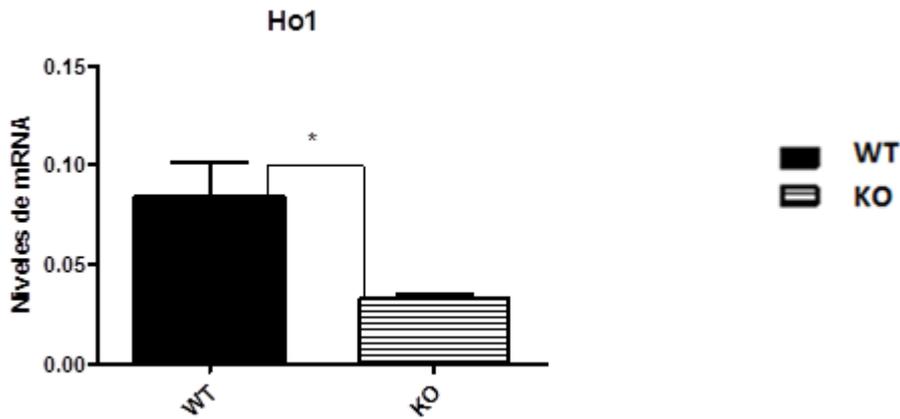
Se observa que generalmente parece existir una relación entre aumento de expresión de dichos marcadores con aumento de los niveles de glucosa.

#### 4.2.2.3 Caracterización de genes antioxidantes en ratones hembra:

Los marcadores anteriormente analizados en ratones macho jóvenes también se analizaron en ratones hembras para observar las posibles diferencias entre ambos sexos.

Así, se analizó la expresión por Real-Time PCR en 5 hembras control y 5 con delección de IRS2 todas ellas de 2-3 meses de edad (jóvenes) y se obtuvieron los resultados de la Figura 10:

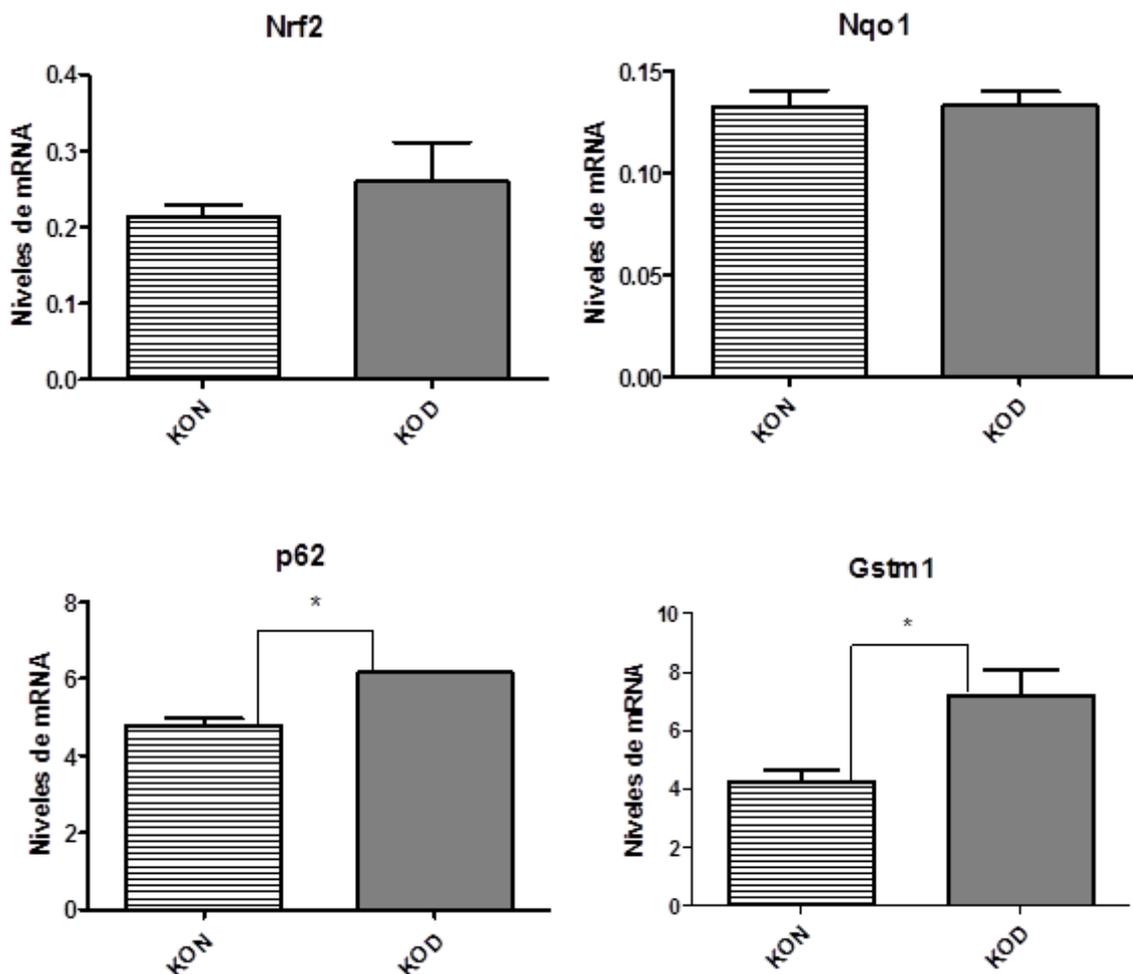


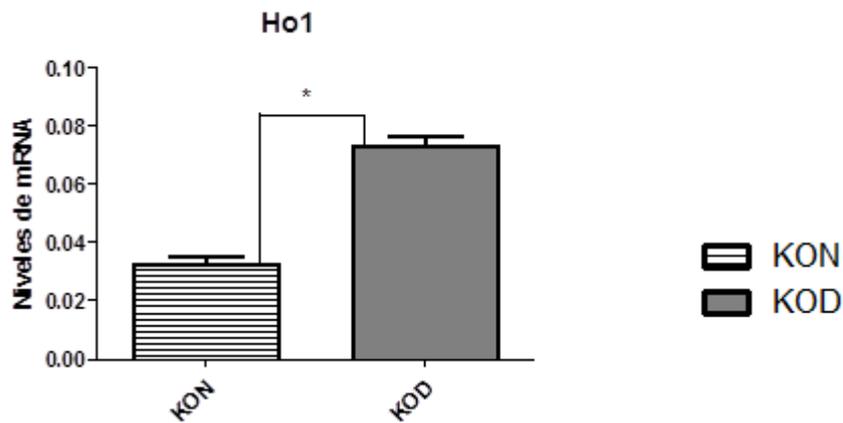


**Figura 10.** Representación gráfica de los niveles de mRNA de marcadores de la vía de señalización de Nrf2 en ratones hembra jóvenes. Se analizan hembras wild type (WT) (negro) y knockout (KO) (rayas) para IRS2. \* p-value <0,05.

Todos los marcadores aparecen mayormente expresados en ratones hembra WT respecto a KO en IRS2, siendo la diferencia significativa en los marcadores p62 y Ho-1.

Además, también se analizaron 3 ratones hembras adultas (10 meses de edad) con genotipo IRS2<sup>-/-</sup> para observar posibles diferencias entre las hembras KO normoglicémicas (jóvenes) analizadas anteriormente y las diabéticas (adultas) y observar si varía la expresión con el envejecimiento (Figura 11):





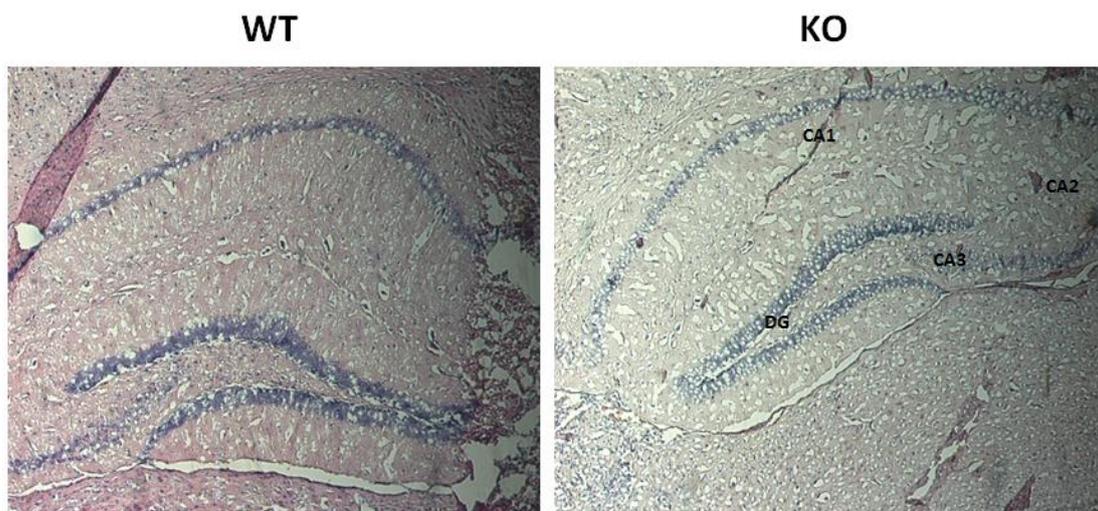
**Figura 11.** Representación gráfica de los niveles de mRNA de marcadores de la vía de señalización de Nrf2 en ratones hembra jóvenes y adultas. Se comparan hembras knockout normoglicémicas (KON, rayas) y hembras knockout diabéticas (KOD, gris). \*  $p$ -value < 0,05.

Al envejecer los ratones hembra los marcadores antioxidantes se expresan más en hembras adultas que en hembras jóvenes, excepto Nqo1, cuyos niveles se mantienen prácticamente invariables. Destacan los marcadores p62, Gstm1 y Ho-1 cuya diferencia es significativa entre hembras KO normoglicémicas (KON) y KO diabéticas (KOD).

### 4.3 DETECCIÓN DE NRF2 Y P62 SOBRE TEJIDO CEREBRAL

#### 4.3.1 Diferencias cerebrales a nivel del hipocampo

Tras la tinción con hematoxilina/eosina de cortes cerebrales de animales macho jóvenes de genotipo silvestre e  $IRS2^{-/-}$  se observaron los resultados de la Figura 12:



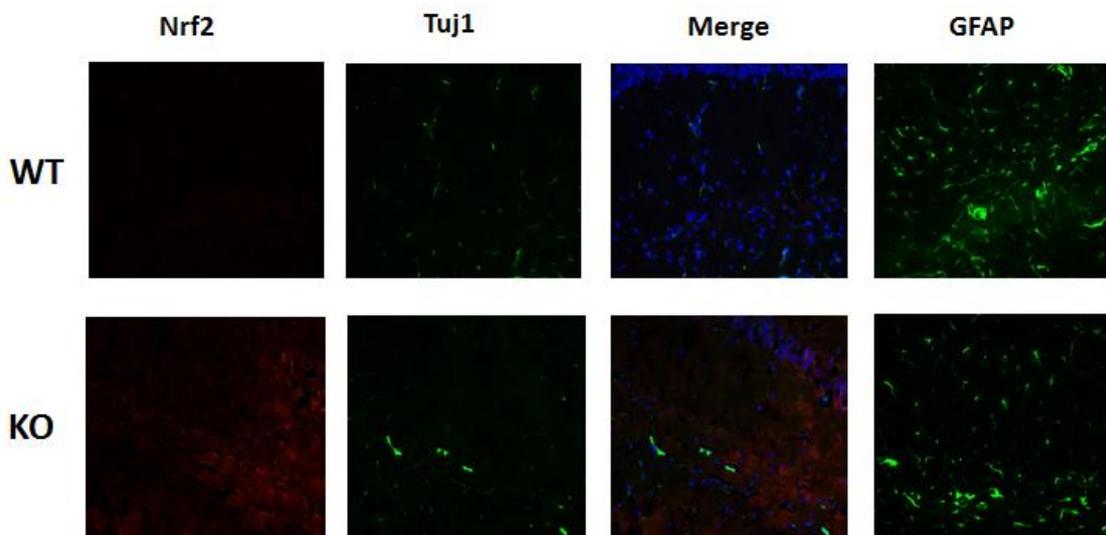
**Figura 12.** Cortes cerebrales correspondientes al hipocampo de ratones macho jóvenes. Se muestran ratones wild type (WT) (izquierda) y knockout (KO) (derecha) para  $IRS2$  tras tinción con hematoxilina/eosina. Observación en el microscopio a 5 aumentos. DG: giro dentado, CA: cornu ammonis.

Es posible diferenciar distintas zonas en el interior del hipocampo como por ejemplo el giro dentado (DG), *Cornu Ammonis* que comprende CA1, CA2 y CA3.

Parecen observarse diferencias estructurales en cuanto al tamaño del hipocampo y todos sus componentes entre los dos grupos de animales.

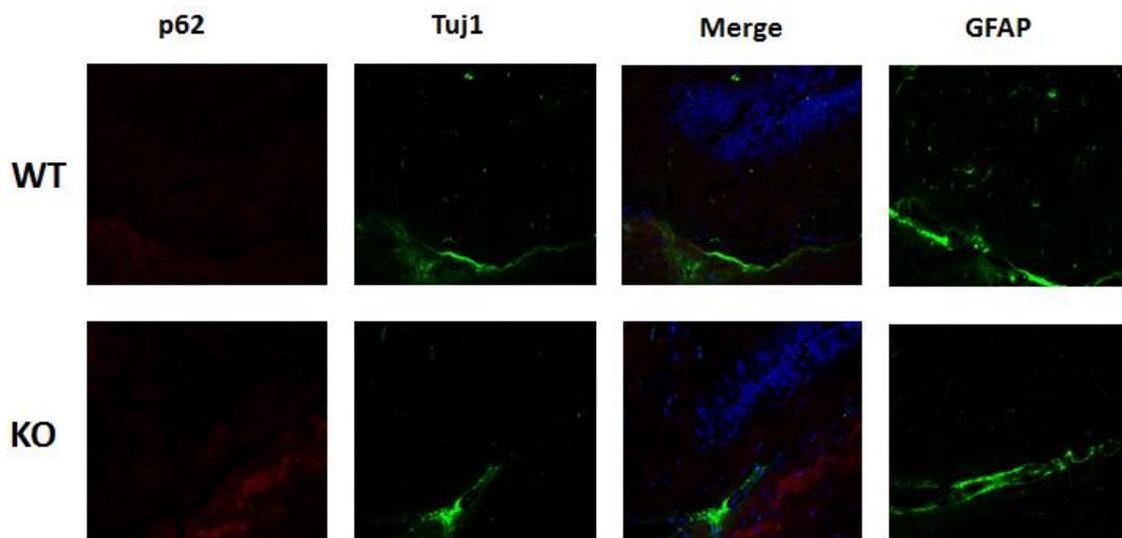
#### 4.3.2 Caracterización de la expresión de marcadores antioxidantes

Se caracterizaron los marcadores Nrf2 (Figura 13) y p62 (Figura 14) sobre tejido cerebral procedente de ratones macho jóvenes de genotipo silvestre e  $IRS2^{-/-}$ . Además de estos dos marcadores, también se caracterizó el marcador GFAP (*glial fibrillary acidic protein*), característico de astrocitos maduros (O'Callaghan, 1991); y Tuj1 (beta-tubulina tipo III), marcador de neuronas en el SNC y periférico (Lee *et al.*, 2005).



**Figura 13. Caracterización de Nrf2 sobre el hipocampo de tejido cerebral de ratones macho jóvenes.** Observación en microscopio a 20 aumentos. Fila de arriba correspondiente a tejido cerebral de animales wild type (WT), y fila de abajo a animales knockout (KO) para  $IRS2$ . Las observaciones se realizaron con una exposición de 12,1 s para Nrf2. Nrf2 (marcador de estrés oxidativo) se observa de color rojo, Tuj1 (marcador neuronal) y GFAP (marcador de glía) de color verde y los núcleos celulares de color azul (marcados con Hoechst).

En el hipocampo, se prestó especial atención a la región CA1, debido a que estas neuronas son particularmente vulnerables al daño (Ramsey *et al.*, 2007). Se observa que el marcador Nrf2 aparece más expresado en los animales de genotipo  $IRS2^{-/-}$  que en los silvestre; además parece observarse que su localización es citoplasmática. Respecto a Tuj1 y GFAP, ambos marcadores aparecen más expresados en animales silvestre.



**Figura 14. Caracterización de p62 sobre el hipocampo de tejido cerebral de ratones macho jóvenes.** Observación con microscopio a 20 aumentos. Fila de arriba correspondiente a tejido cerebral de animales wild type (WT), y fila de abajo a animales knockout (KO) para IRS2. Las observaciones se realizaron con una exposición de 12,1 s para p62. p62 (marcador de autofagia) se observa de color rojo, Tuj1 (marcador neuronal) y GFAP (marcador de células de glía) de color verde y los núcleos celulares de color azul (marcados con Hoechst).

De la misma manera que ocurría con el marcador Nrf2, p62 aparece más expresado en animales KO, al contrario que Tuj1 y GFAP, que aparecen más expresados en animales silvestre.

## 5. DISCUSIÓN

Estudios anteriores han demostrado que el tamaño cerebral de los animales de genotipo silvestre e IRS2<sup>-/-</sup> es distinto, siendo menor en el modelo KO a causa de la disminución en la proliferación neuronal, y también muestran un aumento en la hiperfosforilación de la proteína Tau, un marcador de neurodegeneración característico de la enfermedad de Alzheimer (Schubert *et al.*, 2003). Además también se ha definido el estrés oxidativo como un mecanismo común en la diabetes y en enfermedades neurodegenerativas. Los mecanismos celulares para combatir dicho estrés comprenden la liberación, estabilización y traslocación al núcleo del factor de transcripción Nrf2, que activa la expresión de genes cuyos productos reducen el estrés oxidativo (Buendia *et al.*, 2016).

El análisis de expresión de genes diferencialmente expresados en cerebro dio como resultado una serie de genes que tenían sus niveles alterados (Figura 7). De los 16 genes analizados destacan varios genes interesantes:

Phgdh (*Phosphoglycerate Dehydrogenase*) es una enzima que interviene en la ruta de síntesis del aminoácido L-serina. Si se tiene deficiencia en este enzima disminuye la concentración de los aminoácidos L-serina y glicina provocando desórdenes neurológicos (Furuya and Watanabe, 2003). Además los ratones deficientes en Phgdh presentan microcefalia (Yang *et*

*al.*, 2010), por lo que todo ello junto con los resultados obtenidos parece sugerir que en los ratones deficientes para IRS2 disminuye la expresión de Phgdh provocando daños cerebrales.

La deficiencia en el gen *Atm* (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) es característica de pacientes de ataxia telangiectasia. Una de las funciones de la proteína *Atm* podría ser su papel potencial en la apoptosis neuronal en la enfermedad del Alzheimer (Staropoli, 2008). Así, el aumento de los niveles de expresión en este gen observados en animales de genotipo IRS2<sup>-/-</sup> podría estar ligado a un aumento de la apoptosis neuronal, como también se observó en la disminución en la expresión del marcador neuronal Tuj1 en los ensayos inmunofluorescentes (Figuras 13 y 14).

*Gjb2* (*Gap Junction Protein Beta 2*) es un gen que codifica uno de los miembros de la familia de proteínas que median las uniones gap, llamadas también conexinas. Curiosamente se ha observado un aumento en la expresión de dicho gen en animales KO para IRS2 respecto a silvestres.

*Cplx2* (*Complexin 2*), es un gen cuya eliminación se ha observado que provoca daños cognitivos (Hass *et al.*, 2014). Por tanto los resultados obtenidos en la Figura 7 parecen concordar con que los animales KO para IRS2 al tener menor expresión de *Cplx2* presentan más daños neurológicos.

Tras analizar los niveles de expresión de algunos genes que actúan como respuesta al estrés en ratones macho jóvenes se observó que parece haber un aumento de expresión de estos genes en los animales KO para IRS2 respecto a los WT (Figura 8). Al presentar un déficit de este sustrato del receptor de insulina (IRS2), los animales sufren resistencia a insulina y como consecuencia estrés oxidativo. Pero en el caso de machos jóvenes, estos suelen ser normoglicémicos, es decir, sus niveles de glucosa se mantienen dentro de los normales pero están predispuestos a desarrollar la enfermedad. El estrés oxidativo aparece en las etapas más tempranas de la enfermedad (Ramsey *et al.*, 2007) por eso los resultados sugieren que los animales aunque no tengan sus niveles de glucosa en sangre alterados ya presentan estrés oxidativo y se han activado los mecanismos celulares para combatir dicho daño como se deduce del aumento en la expresión de *Nrf2* y *p62* (Figura 8), cuya diferencia con los animales control es significativa.

Los animales jóvenes utilizados generalmente se califican como normoglicémicos ya que sus niveles de glucosa todavía no suelen estar alterados al presentar pocos meses de vida. Pero al obtener los niveles de glucosa en sangre de algunos ratones machos ya se pudo observar un aumento, que al relacionar con los niveles de expresión de los genes de la vía *Nrf2*, parecen observarse diferencias entre los machos WT y KO para IRS2. Los animales silvestres al no presentar resistencia a insulina no suelen tener estrés oxidativo, por lo que los niveles de expresión de esos marcadores y los niveles de glucosa son menores respecto a los mutantes. Así, la Figura 9 sugiere que los machos IRS2<sup>-/-</sup> presentan valores entre normales y alterados de glucosa con un aumento de expresión de marcadores antioxidantes y los de genotipo silvestres valores normales de glucosa y reducidos en dichos genes.

Tras analizar los mismos marcadores antioxidantes en animales hembra también normoglicémicas se obtuvieron resultados contrarios a los obtenidos en macho, ya que los marcadores antioxidantes aparecen más expresados en animales WT que en KO para IRS2

(Figura 10). Además la diferencia es significativa en genes como p62 y Ho-1, lo que podría sugerir que todavía no se han activado los mecanismos para actuar contra el estrés oxidativo.

Estos resultados sugieren que a las hembras puede no afectarles la resistencia a insulina al mismo tiempo que a los machos. En los estudios llevados a cabo por Burks *et al.* (2000) se sugiere que los defectos en el metabolismo de los carbohidratos tras la eliminación de IRS2 afecta de una manera menos grave a las hembras que a los machos; los machos IRS2<sup>-/-</sup> presentan anomalías en los niveles de glucosa en sangre en torno a las 6 semanas mientras que las hembras IRS2<sup>-/-</sup> presentan los niveles ligeramente alterados, alcanzándose niveles de 120-160 mg/dL de glucosa en sangre en torno a los 4-5 meses de vida.

Por ello se analizaron esos mismos marcadores en hembras IRS2<sup>-/-</sup> de mayor edad, en concreto de 10 meses. En esta ocasión al comparar los niveles de expresión de los marcadores antioxidantes entre hembras IRS2<sup>-/-</sup> jóvenes y adultas se observó un aumento en la expresión en las hembras adultas siendo la diferencia significativa en los genes p62, Gstm1 y Ho-1 (Figura 11). Ello parece sugerir que las hembras desarrollan resistencia a insulina de forma más tardía que los machos, es decir, a las hembras les afecta más tarde la enfermedad y no sufren el estrés oxidativo hasta etapas más avanzadas.

Los resultados obtenidos de las tinciones de tejido cerebral con Hematoxilina-Eosina (Figura 12) parecen demostrar que al ser más pequeño el cerebro de los ratones KO para IRS2 el hipocampo también disminuye su tamaño al observarse de menor tamaño en animales IRS2<sup>-/-</sup> que en silvestres.

Los marcadores Nrf2 y p62 fueron caracterizados sobre tejido cerebral procedente de ratones macho jóvenes WT y KO para IRS2, junto con el marcador neuronal Tuj1 y el de glía GFAP. Respecto a Nrf2 (Figura 13), aparece una mayor cantidad de proteína en animales KO que en WT, lo que parece concordar con los análisis de expresión génica, ya que si se elimina el gen IRS2 los animales sufrirán resistencia a insulina y estrés oxidativo, por lo que la cantidad de proteína de Nrf2 será mayor para combatir dicho estrés. Sin embargo, la función de Nrf2 cuando los animales sufren estrés se encuentra localizada en el núcleo promoviendo la expresión de genes antioxidantes. En los resultados obtenidos en los animales IRS2<sup>-/-</sup> parece observarse que Nrf2 se encuentra localizado en el citoplasma. Estudios previos realizados por Ramsey *et al.* (2007) observaron que Nrf2 en neuronas del hipocampo procedentes de pacientes de Alzheimer tampoco se traslocaba al núcleo o era antigénicamente menos disponible a pesar de la presencia de estrés oxidativo; estaba presente predominantemente en el citoplasma. Todo ello parece sugerir que de alguna manera se está impidiendo la actividad nuclear de Nrf2. En cuanto a Tuj1 y GFAP (Figura 13) se observa una mayor expresión en animales silvestres respecto a mutantes, ya que al eliminar el gen IRS2 aumenta la neurodegeneración.

Respecto a p62 (Figura 14) se observa una mayor expresión de este marcador de autofagia en animales IRS2<sup>-/-</sup> que en silvestres, confirmando los análisis de expresión génica y sugiriendo que los animales KO sufren más estrés oxidativo por lo que hay mayor cantidad de proteína p62. De la misma manera que en los análisis de Nrf2, los marcadores Tuj1 y GFAP aparecen más expresados en animales WT, pero en este caso la diferencia no es tan evidente.

## 6. CONCLUSIONES

Tras comparar los niveles de expresión génica de varios marcadores de neurodegeneración y antioxidantes y su caracterización sobre tejido se pueden obtener las siguientes conclusiones:

- La falta de IRS2 parece afectar a nivel cerebral disminuyendo la expresión de marcadores de proliferación neuronal (Phgdh) y aumentando los marcadores de neurodegeneración (Atm, Cplx2)
- Los animales KO para IRS2 aumentan los niveles de expresión de genes de la vía Nrf2 para combatir el estrés oxidativo, aunque los ratones macho los expresen de forma más prematura que las hembras.
- Los marcadores Nrf2 y p62 se expresan más sobre el hipocampo de ratones IRS2<sup>-/-</sup>, concordando con los análisis de expresión génica.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

ARAKI, E., LIPES, M., PATTI, M., BRÜNING, J., HAAG III, B., JOHNSON, R. and KAHN, C. (1994). Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature*, 372(6502), pp.186-190.

BAILYES, E., NAVÉ, B., SOOS, M., ORR, S., HAYWARD, A. and SIDDLE, K. (1997). Insulin receptor/IGF-I receptor hybrids are widely distributed in mammalian tissues: quantification of individual receptor species by selective immunoprecipitation and immunoblotting. *Biochemical Journal*, 327(1), pp.209-215.

BELFIORE, A., FRASCA, F., PANDINI, G., SCIACCA, L. and VIGNERI, R. (2009). Insulin Receptor Isoforms and Insulin Receptor/Insulin-Like Growth Factor Receptor Hybrids in Physiology and Disease. *Endocrine Reviews*, 30(6), pp.586-623.

BRUNET, A., BONNI, A., ZIGMOND, M., LIN, M., JUO, P., HU, L., ANDERSON, M., ARDEN, K., BLENIS, J. and GREENBERG, M. (1999). Akt Promotes Cell Survival by Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor. *Cell*, 96(6), pp.857-868.

BRÜNING, J., WINAY, J., BONNER-WEIR, S., TAYLOR, S., ACCILI, D. and KAHN, C. (1997). Development of a Novel Polygenic Model of NIDDM in Mice Heterozygous for IR and IRS-1 Null Alleles. *Cell*, 88(4), pp.561-572.

BUENDIA, I., MICHALSKA, P., NAVARRO, E., GAMEIRO, I., EGEA, J. and LEÓN, R. (2016). Nrf2-ARE pathway: An emerging target against oxidative stress and neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Pharmacology & Therapeutics*, 157, pp.84-104.

BURKS, D., DE MORA, J., SCHUBERT, M., WITHERS, D., MYERS, M., TOWERY, H., ALTAMURO, S., FLINT, C. and WHITE, M. (2000). IRS-2 pathways integrate female reproduction and energy homeostasis. *Nature*, 407(6802), pp.377-382.

BURKS, D. and WHITE, M. (2001). IRS proteins and beta-cell function. *Diabetes*, 50(Supplement 1), pp.S140-S145.

CAI, D., DHE-PAGANON, S., MELENDEZ, P., LEE, J. and SHOELSON, S. (2003). Two New Substrates in Insulin Signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5. *Journal of Biological Chemistry*, 278(28), pp.25323-25330.

CARANTONI, M., ZULIANI, G., MUNARI, M., D'ELIA, K., PALMIERI, E. and FELLIN, R. (2000). Alzheimer Disease and Vascular Dementia: Relationships with Fasting Glucose and Insulin Levels. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 11(3), pp.176-180.

CHEN, J., ZHANG, Z. and CAI, L. (2014). Diabetic Cardiomyopathy and Its Prevention by Nrf2: Current Status. *Diabetes & Metabolism Journal*, 38(5), p.337.

CHENG, I., STRAM, D., PENNEY, K., PIKE, M., LE MARCHAND, L., KOLONEL, L., HIRSCHHORN, J., ALTSHULER, D., HENDERSON, B. and FREEDMAN, M. (2006). Common Genetic Variation in IGF1 and Prostate Cancer Risk in the Multiethnic Cohort. *Journal of the National Cancer Institute*, 98(2), pp.123-134.

DEFRONZO, R., BARZILAI, N. and SIMONSON, D. (1991). Mechanism of Metformin Action in Obese and Lean Noninsulin-Dependent Diabetic Subjects\*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 73(6), pp.1294-1301

DE MEYTS, P. (2004). Insulin and its receptor: structure, function and evolution. *BioEssays*, 26(12), pp.1351-1362.

DE MEYTS, P. (2008). The insulin receptor: a prototype for dimeric, allosteric membrane receptors?. *Trends in Biochemical Sciences*, 33(8), pp.376-384.

DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS. (2007). *Diabetes Care*, 31(Supplement 1), pp.S55-S60.

DU, YC., ZHANG, YS., LU, ZX. and TSOU, CL. (1961). Resynthesis of insulin from its glycy and phenylalanyl chains. *Sci Sin*, 10, pp.84-104.

EBINA, Y., ELLIS, L., JARNAGIN, K., EDERY, M., GRAF, L., CLAUSER, E., OU, J., MASIARZ, F., KAN, Y., GOLDFINE, I., ROTH, R. and RUTTER, W. (1985). The human insulin receptor cDNA: The structural basis for hormone-activated transmembrane signalling. *Cell*, 40(4), pp.747-758.

EPSTEIN, F., SHEPHERD, P. and KAHN, B. (1999). Glucose Transporters and Insulin Action — Implications for Insulin Resistance and Diabetes Mellitus. *New England Journal of Medicine*, 341(4), pp.248-257.

FANTIN, V., LAVAN, B., WANG, Q., JENKINS, N., GILBERT, D., COPELAND, N., KELLER, S. and LIENHARD, G. (1999). Cloning, Tissue Expression, and Chromosomal Location of the Mouse Insulin Receptor Substrate 4 Gene. *Endocrinology*, 140(3), pp.1329-1337.

- FINCH, C. and COHEN, D. (1997). Aging, Metabolism, and Alzheimer Disease: Review and Hypotheses. *Experimental Neurology*, 143(1), pp.82-102.
- FROLICH, L., BLUM-DEGEN, D., RIEDERER, P. and HOYER, S. (1999). A Disturbance in the Neuronal Insulin Receptor Signal Transduction in Sporadic Alzheimer's Disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 893(1 OXIDATIVE/ENE), pp.290-293.
- FURUYA, S. and WATANABE, M. (2003). Novel neuroglial and gliogial relationships mediated by L-serine metabolism. *Archives of Histology and Cytology*, 66(2), pp.109-121.
- GERMAN, M., ASHCROFT, S., DOCHERTY, K., EDLUND, H., EDLUND, T., GOODISON, S., IMURA, H., KENNEDY, G., MADSEN, O., MELLOUL, D., MOSS, L., OLSON, K., PERMUTT, M., PHILIPPE, J., ROBERTSON, R., RUTTER, W., SERUP, P., STEIN, R., STEINER, D., TSAI, M. and WALKER, M. (1995). The Insulin Gene Promoter: A Simplified Nomenclature. *Diabetes*, 44(8), pp.1002-1004.
- HARDY, J. and SELKOE, D. (2002). The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science*, 297(5580), pp.353-356.
- HARPER, M., ULLRICH, A. and SAUNDERS, G. (1981). Localization of the human insulin gene to the distal end of the short arm of chromosome 11. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(7), pp.4458-4460.
- HASS, J., WALTON, E., KIRSTEN, H., TURNER, J., WOLTHUSEN, R., ROESSNER, V., SPONHEIM, S., HOLT, D., GOLLUB, R., CALHOUN, V. and EHRlich, S. (2014). Complexin2 modulates working memory-related neural activity in patients with schizophrenia. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 265(2), pp.137-145.
- HEDO, JA., KAHN, CR., HAYASHI, M., YAMADA, KM. and KASUGA, M. (1983) Biosynthesis and glycosylation of the insulin receptor. Evidence for a single polypeptide precursor of the two major subunits. *J Biol Chem* 258, pp. 10020–10026
- HIRASHIMA, Y. (2003). Insulin down-regulates insulin receptor substrate-2 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Journal of Endocrinology*, 179(2), pp.253-266.
- JAIN, A., BLOOM, D. and JAISWAL, A. (2017). Nuclear import and export signals in control of Nrf2. *Journal of Biological Chemistry*, 292(5), pp.2052-2052.
- KAPLAN, S.A. (1984). The insulin receptor. *J Pediatr*, 104(3), pp. 327–336.
- KAYTOR, M. and ORR, H. (2002). The GSK3 $\beta$  signaling cascade and neurodegenerative disease. *Current Opinion in Neurobiology*, 12(3), pp.275-278.
- LANE, W. (1997). The 60-kDa Phosphotyrosine Protein in Insulin-treated Adipocytes Is a New Member of the Insulin Receptor Substrate Family. *Journal of Biological Chemistry*, 272(17), pp.11439-11443.
- LAVIN, D., WHITE, M. and BRAZIL, D. (2016). IRS proteins and diabetic complications. *Diabetologia*, 59(11), pp.2280-2291.
- LAWRENCE, M., MCKERN, N. and WARD, C. (2007). Insulin receptor structure and its implications for the IGF-1 receptor. *Current Opinion in Structural Biology*, 17(6), pp.699-705.
- LEE, S., CHOI, K., AHN, H., SONG, K., CHOE, J. and LEE, I. (2005). TuJ1 (class III  $\beta$ -tubulin) expression suggests dynamic redistribution of follicular dendritic cells in lymphoid tissue. *European Journal of Cell Biology*, 84(2-3), pp.453-459.

- LIU, J., LIU, Y., CHEN, C., CHANG, W. and CHEN, C. (2012). The effect of almonds on inflammation and oxidative stress in Chinese patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized crossover controlled feeding trial. *European Journal of Nutrition*, 52(3), pp.927-935.
- LIU, W., YE, L., HUANG, W., GUO, L., XU, Z., WU, H., YANG, C. and LIU, H. (2016). p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin–proteasome system upon ubiquitinated protein degradation. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 21(1).
- LUCAS, JJ., HERNANDEZ, F., GOMEZ-RAMOS, P., MORAN, MA., HEN, R. and AVILA, J. (2001) Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. *The EMBO Journal*, 20(1), pp.27-39.
- MA, XH., ZHONG, P., GU, Z., FENG, J. and YAN, Z. (2003) Muscarinic potentiation of GABA(A) receptor currents is gated by insulin signaling in the prefrontal cortex. *J Neurosci*, 23(4), pp. 1159–1168.
- MELLOULI, D., MARSHAK, S. and CERASI, E. (2002). Regulation of insulin gene transcription. *Diabetologia*, 45(3), pp.309-326
- NUSSEY, S. W., S. (2001). *Endocrinology: An integrated Approach*.
- O'CALLAGHAN, J.P. ( 1991). Assessment of neurotoxicity: use of glial fibrillary acidic protein as a biomarker. *Biomed. Environ. Sci.* 4, pp. 197–206
- PICK, A., CLARK, J., KUBSTRUP, C., LEVISETTI, M., PUGH, W., BONNER-WEIR, S. and POLONSKY, K. (1998). Role of apoptosis in failure of beta-cell mass compensation for insulin resistance and beta-cell defects in the male Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes*, 47(3), pp.358-364.
- PLUM, L., SCHUBERT, M. and BRÜNING, J. (2005). The role of insulin receptor signaling in the brain. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 16(2), pp.59-65.
- RAIZADA, M., SHEMER, J., JUDKINS, J., CLARKE, D., MASTERS, B. and LEROITH, D. (1988). Insulin receptors in the brain: Structural and physiological characterization. *Neurochemical Research*, 13(4), pp.297-303.
- RAMSEY, C., GLASS, C., MONTGOMERY, M., LINDL, K., RITSON, G., CHIA, L., HAMILTON, R., CHU, C. and JORDAN-SCIUTTO, K. (2007). Expression of Nrf2 in Neurodegenerative Diseases. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 66(1), pp.75-85.
- RODGERS, E. and THEIBERT, A. (2002). Functions of PI 3-kinase in development of the nervous system. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 20(3-5), pp.187-197.
- ROTHER, K., IMAI, Y., CARUSO, M., BEGUINOT, F., FORMISANO, P. and ACCILI, D. (1998). Evidence That IRS-2 Phosphorylation Is Required for Insulin Action in Hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 273(28), pp.17491-17497.
- SALTIEL, A. (2001). New Perspectives into the Molecular Pathogenesis and Treatment of Type 2 Diabetes. *Cell*, 104(4), pp.517-529.
- SANGER, F. (1988). Sequences, Sequences, and Sequences. *Annual Review of Biochemistry*, 57(1), pp.1-29.

- SAWKA-VERHELLE, D., TARTARE-DECKERT, S., WHITE, M. and OBBERGHEN, E. (1996). IRS-2 binds to the insulin receptor through its PTB domain and through a newly identified domain comprising amino acids 591 to 786. *Journal of Biological Chemistry*, 271(11), pp.5980-5983.
- SCHUBERT, M., BRAZIL, D. P., BURKS, D. J., KUSHNER, J. A., YE, J., FLINT, C. L., FARHANG-FALLAH, J., DIKKES, P., WAROT, X. M., RIO, C., CORFAS, G. and WHITE, M. (2003). Insulin receptor substrate-2 deficiency impairs brain growth and promotes tau phosphorylation. *J Neurosci*, 23, pp. 7084-7092.
- SELKOE DJ (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81, pp.741–766.
- SHEPHERD, P., WITHERS, D. and SIDDLE, K. (1998). Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochemical Journal*, 333(3), pp.471-490.
- SHIMOMURA, I. (2000). Decreased IRS-2 and Increased SREBP-1c Lead to Mixed Insulin Resistance and Sensitivity in Livers of Lipodystrophic and ob/ob Mice. *Molecular Cell*, 6(1), pp.77-86.
- STAROPOLI, J. (2008). Tumorigenesis and neurodegeneration: two sides of the same coin?. *BioEssays*, 30(8), pp.719-727.
- STEEN, E., TERRY, B., J. RIVERA, E., CANNON, J., NEELY, T., TAVARES, R., XU, X., WANDS, J. and DE LA MONTE, S. (2005). Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease – is this type 3 diabetes?. *Journal of Alzheimer's Disease*, 7(1), pp.63-80.
- STEINER, D. (1985). Structure and Evolution of the Insulin Gene. *Annual Review of Genetics*, 19(1), pp.463-484.
- SUN, X., WANG, L., ZHANG, Y., YENUSH, L., MYERS JR, M., GLASHEEN, E., LANE, W., PIERCE, J. and WHITE, M. (1995). Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature*, 377(6545), pp.173-177.
- TAMEMOTO, H., KADOWAKI, T., TOBE, K., YAGI, T., SAKURA, H., HAYAKAWA, T., TERAUCHI, Y., UEKI, K., KABURAGI, Y., SATOH, S., SEKIHARA, H., YOSHIOKA, S., HORIKOSHI, H., FURUTA, Y., IKAWA, Y., KASUGA, M., YAZAKI, Y. and AIZAWA, S. (1994). Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature*, 372(6502), pp.182-186.
- TANIGUCHI, C., EMANUELLI, B. and KAHN, C. (2006). Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(2), pp.85-96.
- TAYLOR, S., ACCILI, D. and IMAI, Y. (1994). Insulin Resistance or Insulin Deficiency: Which Is the Primary Cause of NIDDM?. *Diabetes*, 43(6), pp.735-740.
- TORRES, N., NORIEGA, L. and TOVAR, A. (2009). Chapter 9 Nutrient Modulation of Insulin Secretion. *Vitamins & Hormones*, pp.217-244.

- ULLRICH, A., BELL, J., CHEN, E., HERRERA, R., PETRUZZELLI, L., DULL, T., GRAY, A., COUSSENS, L., LIAO, Y., TSUBOKAWA, M., MASON, A., SEEBURG, P., GRUNFELD, C., ROSEN, O. and RAMACHANDRAN, J. (1985). Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature*, 313(6005), pp.756-761.
- VAN DER HEIDE, L., RAMAKERS, G. and SMIDT, M. (2006). Insulin signaling in the central nervous system: Learning to survive. *Progress in Neurobiology*, 79(4), pp.205-221.
- WATSON, G. and CRAFT, S. (2006). Insulin resistance, inflammation, and cognition in Alzheimer's Disease: Lessons for multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, 245(1-2), pp.21-33.
- WHITE, M., MARON, R. and KAHN, C. (1985). Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a Mr-185,000 protein in intact cells. *Nature*, 318(6042), pp.183-186.
- WITHERS, D., GUTIERREZ, J., TOWER, H., BURKS, D., REN, J., PREVIS, S., ZHANG, Y., BERNAL, D., PONS, S., SHULMAN, G., BONNER-WEIR, S. and WHITE, M. (1998). Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature*, 391(6670), pp.900-904.
- WU, J., TSENG, Y., XU, C., NEUBERT, T., WHITE, M. and HUBBARD, S. (2008). Structural and biochemical characterization of the KRLB region in insulin receptor substrate-2. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15(3), pp.251-258.
- YANG, J., WADA, A., YOSHIDA, K., MIYOSHI, Y., SAYANO, T., ESAKI, K., KINOSHITA, M., TOMONAGA, S., AZUMA, N., WATANABE, M., HAMASE, K., ZAITSU, K., MACHIDA, T., MESSING, A., ITOHARA, S., HIRABAYASHI, Y. and FURUYA, S. (2010). Brain-specific Phgdh Deletion Reveals a Pivotal Role for L-Serine Biosynthesis in Controlling the Level of D-Serine, an N-methyl-D-aspartate Receptor Co-agonist, in Adult Brain. *Journal of Biological Chemistry*, 285(53), pp.41380-41390.
- ZHANG, D. (2006). Mechanistic Studies of the Nrf2-Keap1 Signaling Pathway. *Drug Metabolism Reviews*, 38(4), pp.769-789.