



Universidad Autónoma de Madrid

Instituto Cajal (CSIC)

TRABAJO FIN DE GRADO

**El papel de los receptores de insulina e IGF-1
astrocitarios en la modulación de la transmisión
sináptica en condiciones de hiperglucemia**

SOFÍA ZABARA MACHÉS

Laboratorio: Neurofisiología y Plasticidad Sináptica, Instituto Cajal (CSIC).

Curso académico: 2019/2020.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	i
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
1. Neuronas	2
1.1. Potencial de membrana, potencial graduado y potencial de acción	2
2. Astrocitos	4
3. Hipocampo	5
3.1. Anatomía del hipocampo en roedores	5
3.2. Conexiones del hipocampo en roedores	5
4. Glucosa	6
4.1. Metabolismo de la glucosa en el cerebro	6
5. La insulina y el IGF-1	8
5.1. Insulina	8
5.2. IGF-1	9
5.3. Receptores de insulina y de IGF-1	10
5.4. Insulina e IGF-1 en el cerebro	11
6. Hiperglucemia	11
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	12
MATERIALES Y MÉTODOS	13
1. Animales de experimentación	13
2. Líquido cefalorraquídeo artificial	13
3. Obtención de rodajas de cerebro	13
4. Registros electrofisiológicos	13

5. Análisis estadísticos	15
RESULTADOS	16
1. Efecto de la hiperglucemia sobre la transmisión sináptica y la actividad neuronal	16
2. Importancia de los astrocitos en la transmisión sináptica y la actividad neuronal durante la hiperglucemia	18
2.1. Efecto de la hiperglucemia sobre la transmisión sináptica y la actividad neuronal en ratones deficientes en receptores de insulina astrocitarios	18
2.2. Efecto de la hiperglucemia sobre la transmisión sináptica y la actividad neuronal en ratones deficientes en receptores de IGF-1 astrocitarios	19
2.3. Papel de los receptores de insulina e IGF-1 en astrocitos para mantener la transmisión sináptica y la actividad neuronal durante la hiperglucemia	20
DISCUSIÓN	23
1. Consecuencias de la hiperglucemia sobre la función neuronal	23
2. La importancia de la insulina en el metabolismo de la glucosa por parte de los astrocitos	24
3. La importancia del IGF-1 en el metabolismo de la glucosa por parte de los astrocitos	25
4. Implicaciones patológicas	26
CONCLUSIONES	27
BIBLIOGRAFÍA	28

ABREVIATURAS

μL: microlitro.

μm: micrómetro.

μs: microsegundo.

ALS: acid-labile subunit/subunidad ácido-lábil.

ATP: adenosín trifosfato.

BHE: barrera hematoencefálica.

C°: grados centígrados.

Ca²⁺: calcio.

CA: *Cornu Ammonis*/asta de Amón.

CA1: *Cornu Ammonis* 1/asta de Amón 1.

CA2: *Cornu Ammonis* 2/asta de Amón 2.

CA3: *Cornu Ammonis* 3/asta de Amón 3.

CE: corteza entorrinal.

Cl: cloro.

CO₂: dióxido de carbono.

CS: fibras colaterales de Schaffer.

CSIC: Centro Superior de Investigaciones Científicas.

Cys: cisteína.

ddv: dependiente de voltaje.

EA: Enfermedad de Alzheimer.

EAAT 1: excitatory amino acid transporter 1/transportador de aminoácidos excitatorios 1.

EAAT 2: excitatory amino acid transporter 2/transportador de aminoácidos excitatorios 2.

FM: fibras musgosas.

fPS: field Population Spike/espiga poblacional de campo.

GABA: gamma-Aminobutyric acid/ácido γ-aminobutírico.

GD: giro dentado.

GH: growth hormone/hormona del crecimiento.

GLUT1: glucose transporter 1/transportador de glucosa 1.

GLUT3: glucose transporter 3/transportador de glucosa 3.

Hz: hertz/hercios.

IGF-1: insulin-like growth factor-1/factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1.

IGFBPs: IGF-1 binding proteins/proteínas de unión al IGF-1.

IGFBP-3: IGF-1 binding protein 3/proteína 3 de unión al IGF-1.

IGF-1R: IGF-1 receptor/receptor de IGF-1.

IR: insulin receptor/receptor de insulina.

IRS: insulin receptor substrate/sustrato del receptor de insulina.

IRS1: insulin receptor substrate 1/sustrato del receptor de insulina1.

IRS2: insulin receptor substrate 2/sustrato del receptor de insulina2.

K⁺: potasio.

KO: knockout.

KO IR: knockout para receptores de insulina.

KO IGF-1R: knockout para receptores de IGF-1.

LCFA: líquido cefalorraquídeo artificial.

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinases/proteínas quinasas activadas por mitógenos.

MCT1: monocarboxylate transporter 1/transportador de monocarboxilatos 1.

MCT2: monocarboxylate transporter 2/transportador de monocarboxilatos 2.

mM: milimolar.

mV: milivoltios.

n: tamaño de la muestra.

Na⁺: sodio.

O₂: oxígeno.

PA: potencial de acción.

pH: potencial de hidrógeno.

PIK3-Akt: phosphoinositide 3-kinase-protein kinase B/fosfoinositol 3-quinasa-proteína quinasa B.

RE: retículo endoplasmático.

ROS: reactive oxygen species/especies reactivas de oxígeno.

Sb: subículo.

SD: standard deviation/desviación estándar.

SEM: standard error of the mean/error estándar de la media.

SN: sistema nervioso.

SNC: sistema nervioso central.

SRP: Signal Recognition Particle/partícula de reconocimiento de señal.

SR: *Stratum Radiatum*.

Tyr: tirosina.

VCA: vía comisural asociativa.

VP: vía perforante.

WT: wild type/salvaje.

Zn²⁺: Zinc.

RESUMEN

El cerebro es el órgano que más energía consume debido a que tiene que mantener su alta actividad y la glucosa es su principal fuente de energía. Ésta primero debe atravesar la barrera hematoencefálica para poder llegar al parénquima cerebral y una vez allí servir como nutriente a las neuronas. Sin embargo, las neuronas no son las únicas encargadas de metabolizar la glucosa, sino que los astrocitos también tienen un papel muy importante en el metabolismo, el transporte y el almacenaje de la glucosa. Este hecho está estrechamente relacionado con la acción de la insulina y el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1) en los astrocitos. No obstante, aunque la glucosa es esencial e imprescindible para el metabolismo cerebral, si se produce un exceso de ésta en el cerebro puede ser perjudicial para las células. Por ello, la hiperglucemia puede estar relacionada con ciertas patologías neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer. Por tanto, el objetivo de este trabajo ha sido estudiar el papel de los astrocitos, la insulina y el IGF-1 en el metabolismo de la glucosa durante la hiperglucemia y sus consecuencias en la transmisión sináptica y la actividad neuronal. Para ello, se han realizado estudios electrofisiológicos, registrando la espiga poblacional en rodajas de cerebro de ratón sometidas a diferentes condiciones de hiperglucemia. Se han utilizado animales silvestres y animales modificados genéticamente deficientes en el receptor de insulina o en el receptor de IGF-1, específicamente en astrocitos.

PALABRAS CLAVE: Hiperglucemia, glucosa, neuronas, astrocitos, insulina, IGF-1, transmisión sináptica, espiga poblacional, actividad neuronal, receptor de insulina, receptor de IGF-1, electrofisiología, hipocampo, estrés oxidativo.

INTRODUCCIÓN

Existe una gran diversidad de células en el sistema nervioso (SN), células de diferentes formas, funciones y tamaños, que se comunican entre sí y que tienen una alta capacidad de coordinación y organización, haciendo de este sistema uno de los más complejos (**Figura 1**).

Sin embargo, no fue hasta finales del siglo XIX, cuando Santiago Ramón y Cajal consideró que el SN estaba formado por células independientes (las neuronas) que se comunicaban entre sí estableciendo una red de conexiones y no como un tejido único como se pensaba hasta entonces.

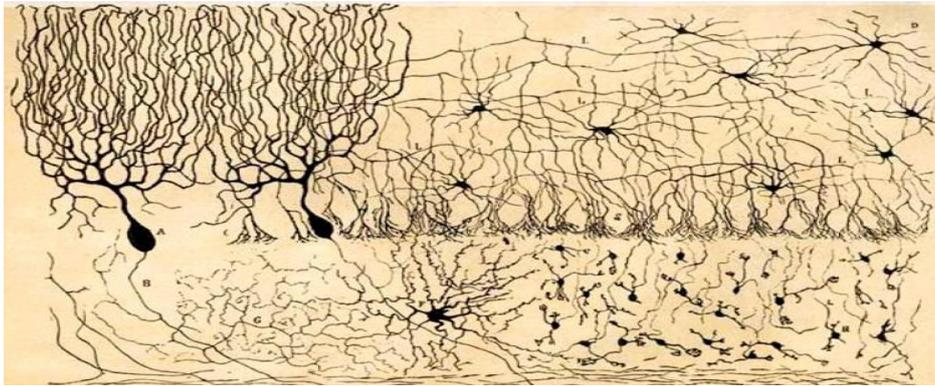


Figura 1. Dibujo de Ramón y Cajal sobre las células del cerebelo de un pollo, mostrado en “Estructuras de los centros nerviosos de las aves”, 1905.

1. Neuronas

Las neuronas son las células encargadas de recibir y procesar información procedente de estímulos tanto externos como internos y de transmitirla mediante señales eléctricas y químicas. Están formadas por las dendritas (pequeñas prolongaciones apicales receptoras de los estímulos de otras neuronas), el soma (cuerpo celular), el axón (prolongación que conduce el impulso nervioso a otras neuronas) y el botón sináptico (zona terminal del axón donde se da la sinapsis) (Salatino, 2013). En la sinapsis química, una primera neurona (presináptica) libera unas moléculas, denominadas neurotransmisores, que son capturados por una segunda neurona (postsináptica), dándose así la transmisión. Sin embargo, en la sinapsis eléctrica, se produce la transmisión del impulso nervioso mediante el flujo de iones de la neurona presináptica a la postsináptica a través de uniones gap (Duque et al., 1997).

1.1. Potencial de membrana, potencial graduado y potencial de acción

La membrana de una neurona separa su medio interno, donde hay potasio (K^+) y otro tipo de aniones, del medio externo, donde hay sodio (Na^+) y cloro (Cl^-). Sin embargo, la concentración

iónica es diferente en ambos medios (quedando cargado negativamente el interior y positivamente el exterior) produciendo así una diferencia de potencial entre ambos lados que se denomina potencial de membrana. Por tanto, debido al balance de cargas, el potencial de membrana de una neurona en reposo es negativo, entre -60 mV y -70 mV. Para mantener este potencial, en la neurona se produce un transporte de K^+ al exterior mediante canales de fuga de K^+ y un transporte activo de Na^+ al exterior y K^+ al interior mediante bombas de Na^+/K^+ . Cuando un estímulo provoca la apertura de canales iónicos produciendo la entrada de Na^+ , la membrana se despolariza (el potencial de membrana se vuelve menos negativo) y la neurona genera un potencial graduado, una respuesta del mismo tamaño que el estímulo y que se extingue a medida que se transmite (Martín, 2018; Salatino, 2018). Sin embargo, cuando la despolarización llega al cono axónico y es lo suficientemente grande para abrir canales de Na^+ dependientes de voltaje, se produce una entrada masiva de sodio que hace que se despolarice más la membrana y se produzca un potencial de acción (PA) (Figura 2). Este potencial solo se dispara si la despolarización inicial llega hasta cierto umbral, su amplitud siempre es la misma independientemente del tamaño del estímulo (siempre y cuando pase el umbral), se produce en el cono axónico donde se encuentran los canales dependientes de voltaje y donde se integra toda la información, y se transmite a lo largo del axón. En el PA, el interior queda cargado positivamente y el exterior negativamente (Hodgkin y Huxley, 1952; Martín, 2018).

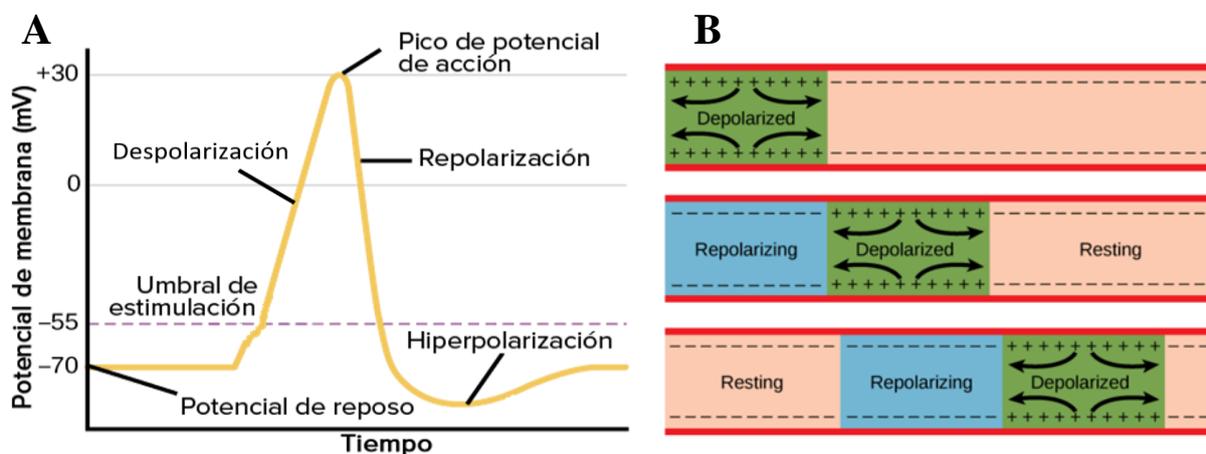


Figura 2. (A) Fases del potencial de acción: un estímulo consigue despolarizar la membrana hasta el umbral de estimulación (-55 mV), se abren los canales de Na^+ ddiv y se produce una entrada masiva de Na^+ despolarizando la membrana y produciendo el pico máximo del potencial de acción ($+30$ mV). Entonces se inactivan los canales de Na^+ ddiv y la salida de K^+ a través de los canales de K^+ ddiv hace que se repolarice la membrana hasta llegar al potencial de reposo. Sigue saliendo K^+ lo que produce una hiperpolarización de la membrana (se hace aún más negativo el potencial de membrana), se cierran los canales de K^+ ddiv y las bombas de Na^+/K^+ se encargan de devolver el K^+ al interior y el Na^+ al exterior recuperando el potencial de membrana (-70 mV). (B) Transmisión del potencial de acción a través del axón, en reposo el interior tiene carga negativa y el exterior carga positiva, durante el PA se invierten las cargas. Adaptado de Zedalis y Eggebrecht, 2018.

Existe una gran variedad de neuronas clasificadas según su morfología (piramidales, estrelladas, etc.), función (motoras o sensoriales,), polaridad (unipolares, bipolares, etc.), neurotransmisor (colinérgicas, dopaminérgicas, etc.). Sin embargo, no son las únicas células del SN, también existen las células de la glía y son más abundantes que las neuronas. Entre los distintos tipos de células gliales se encuentran los astrocitos.

2. Astrocitos

Los astrocitos son un tipo de glía que solo se encuentra en el sistema nervioso central (SNC) y tienen una morfología estrellada (**Figura 3**). Esto les permite comunicarse entre ellos formando una amplia red mediante uniones gap e intervenir en múltiples transmisiones sinápticas (Martínez-Gómez, 2014). Los astrocitos se encuentran modulando y aislando la sinapsis entre la neurona presináptica y la neurona postsináptica, evitando así la difusión lateral de los neurotransmisores y formando la sinapsis tripartita (Allen y Barres, 2009; Araque et al., 1999) (**Figura 4**). También tienen un papel muy importante en el metabolismo, almacenando glucógeno y aportando a las neuronas fuentes de energía como glucosa, lactato y glutamina; regulan la concentración del potasio extracelular y el pH extracelular; tienen función neuroprotectora, participando en la respuesta al daño celular; y forman parte de la barrera hematoencefálica. Además, algunos neurotransmisores como el glutamato pueden provocar un aumento en el calcio intracelular de los astrocitos, produciendo ondas de calcio que se transmiten a través de la red astrocitaria, creando una forma de excitabilidad basada en corrientes de calcio y permitiendo a los astrocitos liberar gliotransmisores (Cornell-bell et al, 1990; Perea y Araque, 2003).

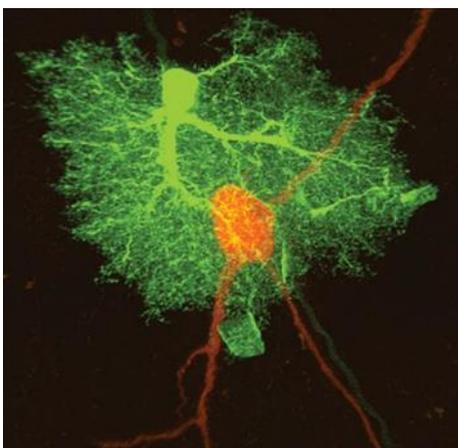


Figura 3. Imagen de un astrocito (verde) envolviendo una neurona (rojo). Adaptado de Allen y Barres, 2009.

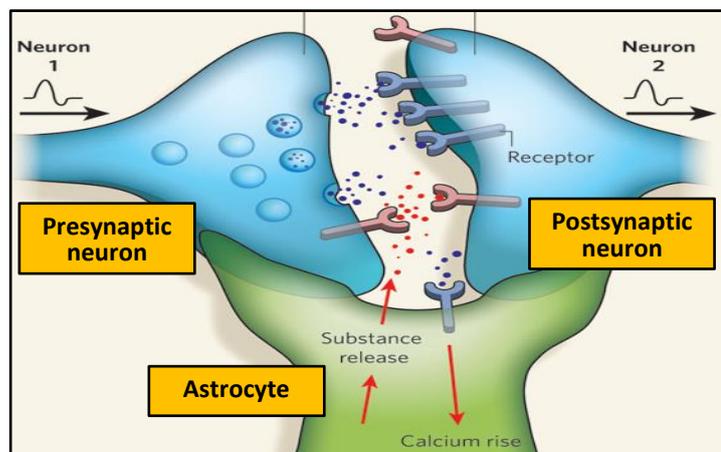


Figura 4. Esquema de la sinapsis tripartita entre una neurona presináptica, una neurona postsináptica y un astrocito. Adaptado de Allen y Barres, 2009.

3. Hipocampo

El hipocampo es una estructura que se encuentra en ambos hemisferios del cerebro y forma parte de la formación hipocampal junto con el giro dentado, el subículo y la corteza entorrinal (**Figura 5**). En primates y humanos se encuentra en el lóbulo temporal medial. Aunque se ha estudiado poco en humanos, es una de las principales regiones de estudio en neurofisiología en roedores debido a su estructura sencilla y bien organizada, además de tener una gran plasticidad estructural y funcional (Korovaichuk, 2013). El hipocampo tiene un papel importante en la memoria declarativa o explícita, que son aquellos recuerdos que se pueden evocar de manera consciente como hechos y acontecimientos. También interviene en la memoria espacial y en la orientación y es una de las estructuras que constituye el sistema límbico, el cual se encarga de las emociones, el aprendizaje, el comportamiento, etc. (Olivares et al., 2015).

3.1. Anatomía del hipocampo en roedores

El hipocampo al igual que el giro dentado está formado por tres capas, una capa principal de somas densamente empaquetados que se encuentra entre dos capas de células dispersas. La capa principal del hipocampo se denomina capa piramidal o asta de Amón (*Cornu Ammonis*, CA), que contiene los somas de las neuronas piramidales excitatorias y se divide en tres regiones: CA1, CA2 y CA3. Además, se divide en varios estratos, ordenados del más superficial al más profundo: *stratum alveus*, *stratum oriens*, *stratum pyramidale*, *stratum lucidum* (único de CA3), *stratum radiatum* y *stratum lacunosum-moleculare*. La capa principal del giro dentado es la capa granular, que se dispone en forma de V tumbada y contiene los somas de las células granulares (Albiñana Durá, 2014; Fernández Lamo, 2009; Moreno et al., 2013).

3.2. Conexiones del hipocampo en roedores

Las células del giro dentado, de CA1, de CA3 y del subículo son invadidas por los axones de las células de la corteza entorrinal (vía perforante). Los axones de las células granulares del giro dentado se ramifican (fibras musgosas) y forman sinapsis con las células piramidales de CA3. Los axones de las células piramidales de CA3 se ramifican y forman sinapsis con las células piramidales de CA1 del hipocampo ipsilateral (fibras colaterales de Schaffer) y del hipocampo contralateral (vía comisural asociativa). Los axones de las células piramidales de CA1 también se ramifican y forman sinapsis con las células del subículo y de la corteza entorrinal. A su vez los axones de las células del subículo forman sinapsis con las células de la corteza entorrinal.

Por tanto, en la corteza entorrinal converge la información de llegada y de salida de las demás regiones de la formación hipocampal (Albiñana Durá, 2014; Fernández Lamo, 2009) (**Figura 6**). Además, en este circuito también intervienen otras conexiones como interneuronas inhibitorias y aferencias moduladoras de otras regiones exteriores a la formación hipocampal.

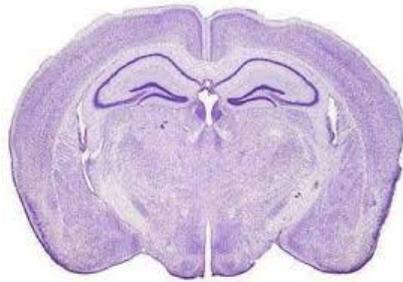


Figura 5. Formación hipocampal (morado oscuro) en el cerebro de una ratona. Adaptado de Palumbo, 2011.

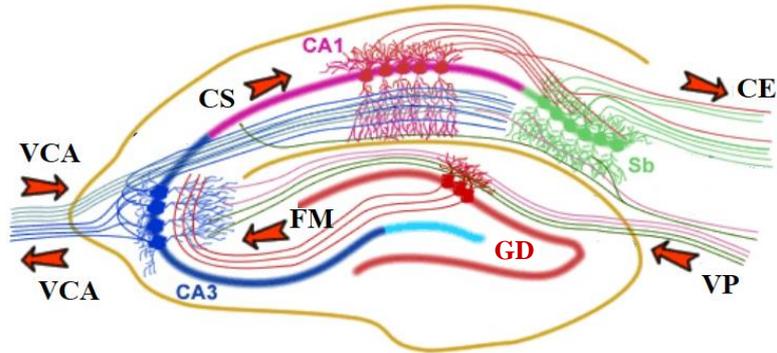


Figura 6. Regiones y conexiones de la formación hipocampal: giro dentado (GD), CA3, CA1, subículo (Sb), corteza entorrinal (CE), vía perforante (VP), fibras musgosas (FM), vía comisural asociativa (VCA), colaterales de Schaffer (CS). Adaptado de Fernández Lamo, 2009.

4. Glucosa

La glucosa es un glúcido monosacárido, un compuesto orgánico utilizado en el metabolismo tanto en procesos catabólicos como anabólicos. Es la principal fuente de energía de las células, pues la glucosa es degradada mediante oxidación (glucólisis) en compuestos más simples (lactato, piruvato) liberando energía en forma de adenosín trifosfato (ATP), proceso que forma parte de la respiración celular. A parte de servir como combustible para la respiración celular, también participa en procesos anabólicos como en la síntesis de glucógeno (glucogenogénesis), un polisacárido de almacenamiento.

4.1. Metabolismo de la glucosa en el cerebro

El cerebro es el órgano que más glucosa consume para poder cubrir su alto gasto energético y así mantener su actividad (Jaramillo-Magaña, 2013). No obstante, para que la glucosa pueda introducirse en el cerebro debe atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) que separa el SNC de los capilares sanguíneos, impidiendo el intercambio libre de moléculas. La BHE está formada por células endoteliales que rodean los capilares sanguíneos y que están en contacto con pericitos, astrocitos y neuronas (Escobar y Gómez, 2008; Hernández, 2014) (**Figura 7**).

La glucosa traspasa la BHE a través de GLUT1 (transportador de glucosa 1) que se encuentra en la membrana de las células endoteliales. Luego entra en los astrocitos atravesando su membrana también mediante GLUT1. En su interior, es oxidada a lactato o piruvato mediante la glucólisis o es almacenada en forma de glucógeno, que es la principal reserva energética del cerebro (se encuentra mayoritariamente en astrocitos). Luego, el lactato generado en los astrocitos es liberado al medio extracelular a través de MCT1 (transportador de monocarboxilatos 1). Finalmente, las neuronas pueden capturar el lactato a través de MCT2 (transportador de monocarboxilatos 2) o glucosa a través de GLUT3 (transportador de glucosa 3). Éstos mediante la glucólisis son degradados a piruvato, el cual entrará en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ciclo de Krebs) para producir la energía necesaria para la célula (Díaz y Burgos, 2002; Hernández, 2014; Magistretti y Pellerin, 1999) (**Figura 8**).

Además, la glucosa es precursora de neurotransmisores como el glutamato (principal neurotransmisor excitador), el cual es reciclado por los astrocitos. Éste es capturado a través de EAAT1 y EAAT2 (transportadores de aminoácidos excitadores 1 y 2), transformado en glutamina y ésta a su vez es retornada a las neuronas para volver a metabolizar glutamato (Hernández, 2014; Magistretti y Pellerin, 1999).

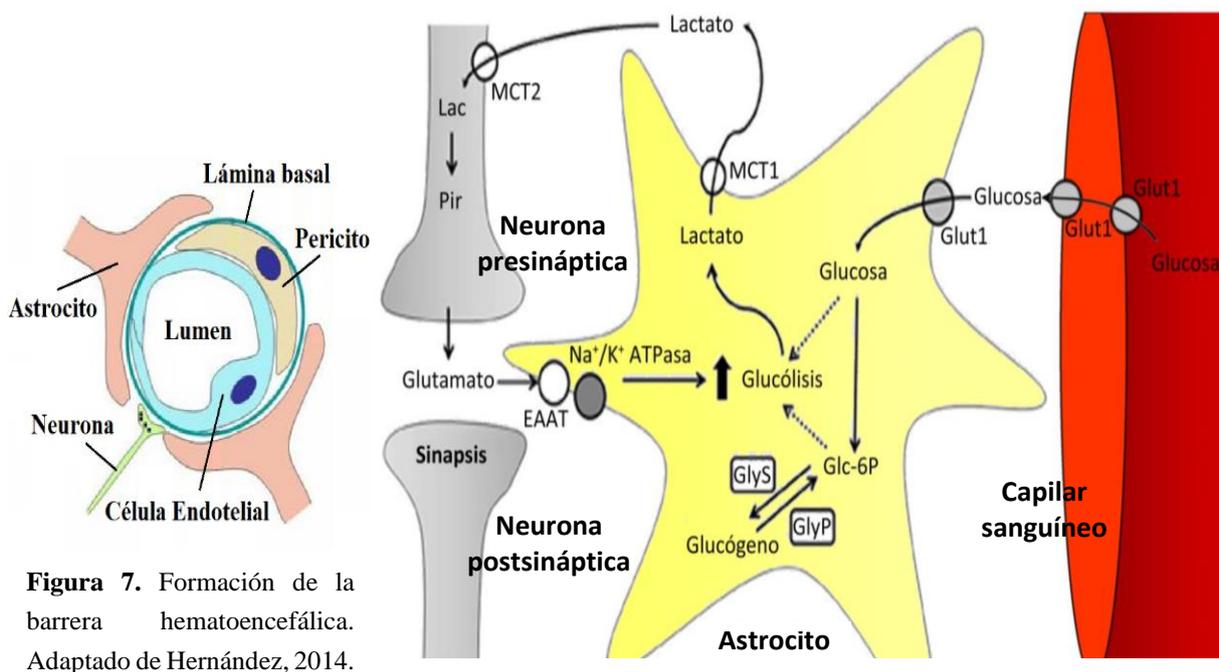


Figura 7. Formación de la barrera hematoencefálica. Adaptado de Hernández, 2014.

Figura 8. Esquema del transporte y metabolismo de la glucosa en el cerebro: la glucosa atraviesa la BHE y entra en los astrocitos mediante GLUT1, es almacenada en forma de glucógeno o degradada a lactato que saldrá a través de MCT1 y entrará a la neurona mediante MCT2. En la neurona será metabolizada aportando energía y neurotransmisores como el glutamato, el cual una vez realizada su función entrará en los astrocitos mediante EAAT y será reciclado. Adaptado de Hernández, 2014.

5. La insulina y el IGF-1

5.1. Insulina

La insulina es una hormona polipeptídica de 51 aminoácidos muy preservada a lo largo de la evolución debido a su parecido estructural entre diferentes especies animales. Su principal función es disminuir la concentración de glucosa en sangre favoreciendo su incorporación a las células. Por ello, tiene un papel importante en la regulación del metabolismo de la glucosa, estimulando la glucogenogénesis y la glucólisis e inhibiendo la glucogenólisis. También interviene en la síntesis de lípidos, proteínas y otros glúcidos (De Luis y Romero, 2012).

La insulina es producida y secretada por las células beta que se encuentran en el páncreas formando los islotes de Langerhans. Su síntesis comienza con el precursor preproinsulina que es sintetizada en los ribosomas. Esta preproinsulina está formada por un péptido señal de 24 aminoácidos, un dominio B de 30 aminoácidos, un péptido conector de 30 aminoácidos (péptido C) y un dominio A de 21 aminoácidos. El péptido señal dirige la preproinsulina de los ribosomas al retículo endoplasmático (RE), gracias a una partícula de reconocimiento de señal (SRP). Una vez en el RE, una proteasa corta el péptido señal produciendo la proinsulina. Ésta es transportada del RE al aparato de Golgi, donde es introducida en vesículas secretoras ricas en cinc (Zn^{2+}) y calcio (Ca^{2+}). Dentro de estas vesículas la proinsulina forma hexámeros y unas proteasas cortan el péptido C (región central), quedando la cadena A (extremo C-terminal) y la cadena B (extremo N-terminal). Estas dos cadenas son las que dan lugar a la insulina y están conectadas entre sí mediante dos enlaces disulfuro y otro enlace disulfuro intramolecular en la cadena A (Brezar et al., 2011; De Luis y Romero, 2012; Morimoto, 2000) (**Figura 9**).

La insulina queda almacenada en forma de hexámero (seis hormonas de insulina), que es una forma más estable, y permanece inactiva. Pero cuando se activa actúa como un monómero (una única hormona de insulina) que, a pesar de ser menos estable, su difusión es mucho más rápida (De Luis y Romero, 2012).

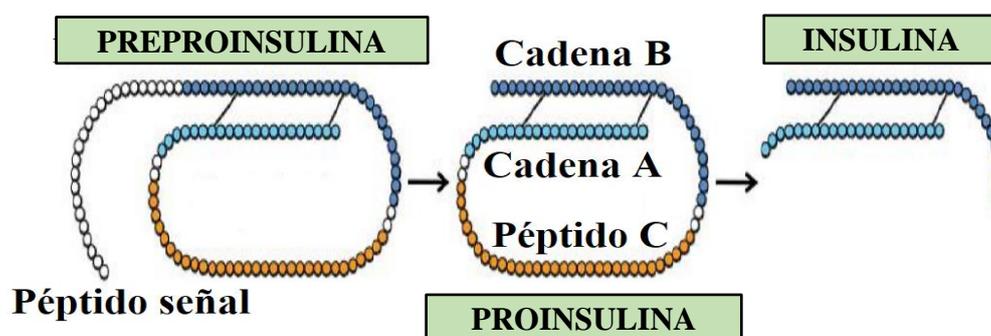


Figura 9. Estructura preproinsulina, proinsulina e insulina. Adaptado de Brezar et al., 2011.

5.2. IGF-1

El factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 o IGF-1 (insulin-like growth factor-1) es un polipéptido de 70 aminoácidos. Es una única cadena formada por el dominio A, el dominio B, el péptido C que une los anteriores y el dominio D (extremo N-terminal). Los dominios A y B son parecidos a los de la insulina, además también tiene los tres enlaces disulfuro, y el péptido C es semejante al de la proinsulina (**Figura 10**). Su parecido explica la habilidad que tiene para unirse al receptor de insulina, aunque con una baja afinidad. Está implicado en múltiples procesos metabólicos necesarios para la regulación del crecimiento, desarrollo y diferenciación tisular. Puede también transportar glucosa, sintetizar proteínas y actuar como una hormona con efectos autocrinos, paracrinos o endocrinos (Delafontaine et al., 2004; Laron, 2001).

El IGF-1 es sintetizado y liberado principalmente por el hígado (más del 90%), aunque también puede ser sintetizado por otros tejidos del cuerpo. Su síntesis es estimulada por la hormona del crecimiento (GH), por tanto, varía en las distintas etapas del desarrollo humano. También está influenciada por el estado nutricional (Muñoz, 2013; Xu et al., 1995).

Generalmente esta hormona no actúa sola, sino que alrededor de un 90 % del total de IGF-1 se encuentra constantemente unido a unas proteínas, las IGFBPs (IGF-binding proteins). Son proteínas que transportan IGF-1 y regulan su distribución, disponibilidad y actividad, existen 10 tipos y la más afín y abundante es IGFBP-3. Cuando IGFBP-3 se une al IGF-1 forman un complejo tripartito junto con otra proteína, la subunidad ácido-lábil (ALS). Este complejo tiene una vida media de 16 horas, a diferencia del IGF-1 libre que dura menos de 15 minutos, por eso la concentración de IGF-1 libre es mínima y la mayor parte del IGF-1 se encuentra formando este complejo (alrededor del 80%). Sin embargo, también puede formar complejos con otras IGFBPs (Clemmons, 2007; Laron, 2001; Muñoz, 2013).

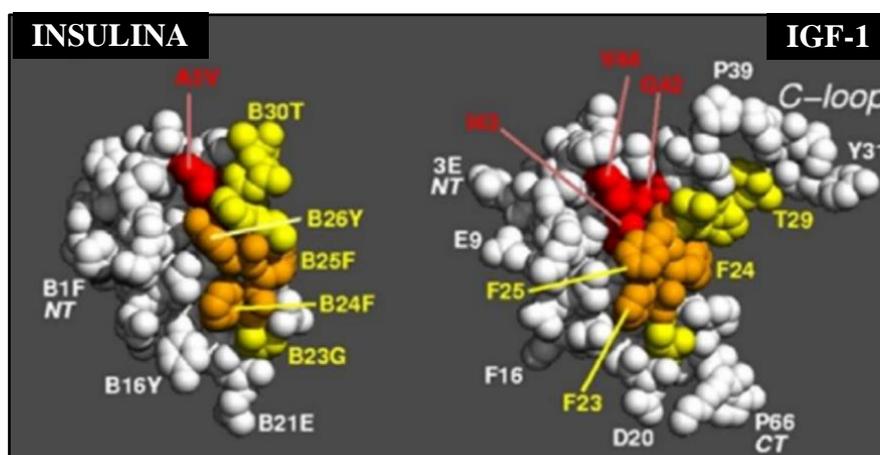


Figura 10. Homología estructural entre insulina (izquierda) e IGF-1 (derecha). Adaptado de Muñoz, 2013.

5.3. Receptores de insulina y de IGF-1

Al igual que la insulina y el IGF-1 tienen una estructura muy semejante, sus receptores también son muy parecidos, por ello, la insulina se puede unir al receptor de IGF-1 y viceversa, aunque con muy poca afinidad (De Meyts y Whittaker, 2002) (**Figura 11**).

El receptor de insulina (IR) y el receptor de IGF-1 (IGF-1R) son glicoproteínas transmembrana de tipo tirosina quinasa pertenecientes a la familia de los receptores para factores de crecimiento. Están formados por dos subunidades α y dos subunidades β . Las subunidades α se localizan en el exterior celular, están unidas por enlaces disulfuro, y contienen las regiones de unión a la insulina o al IGF-1, y una región rica en cisteína (Cys). Las subunidades β contienen una parte en el exterior, unida a las subunidades α por enlaces disulfuro, y una en el interior, donde se encuentra el sitio de unión a ATP y los sitios de fosforilación de tirosina (Tyr) (De Meyts y Whittaker, 2002; Laron, 2001; Olivares y Arellano, 2008) (**Figura 12**).

Cuando la insulina y el IGF-1 se unen a sus respectivos receptores, las subunidades α cambian su conformación, lo que les permite activar a las subunidades β . Éstas se autofosforilan, es decir, transfieren un grupo fosfato del ATP a las regiones de tirosina. Éste puede ser un proceso de cis- (se produce en la misma subunidad β) o trans- (se produce entre las dos subunidades β). Esta activación del receptor inicia la cascada de señalización con dos vías principales de transducción: la vía de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK), por la cual se regula la síntesis de proteínas, y la vía de la fosfoinositol 3-quinasa/proteína quinasa B (PI3K/Akt), por la cual se regula el metabolismo de la glucosa y de lípidos. (De Meyts y Whittaker, 2002; Laron, 2001; Olivares y Arellano, 2008).

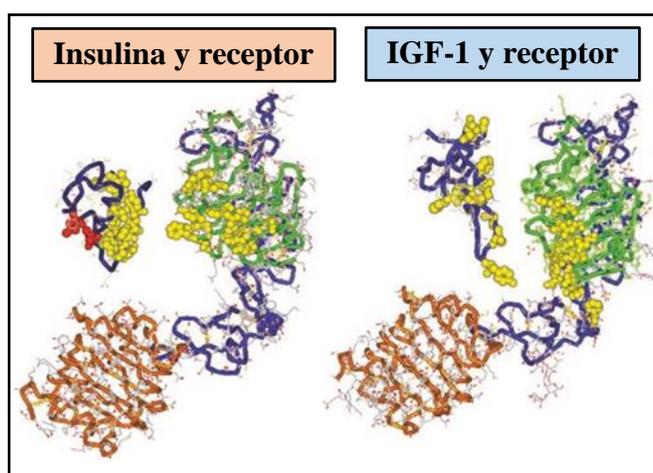


Figura 11. Estructura tridimensional de la insulina y su receptor (izquierda) y del IGF-1 y su receptor (derecha), que muestra el gran parecido entre ambos. Adaptado de De Meyts y Whittaker, 2002.

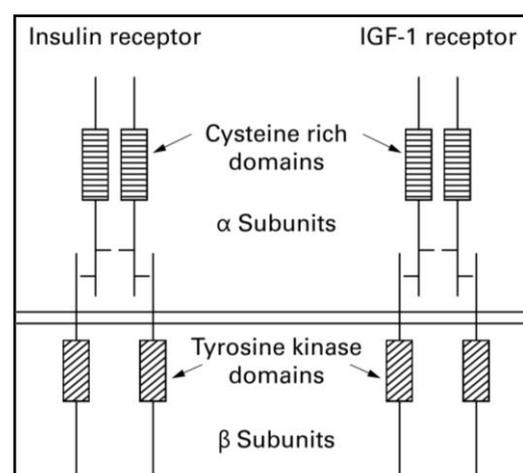


Figura 12. Subunidades α y β de los receptores tirosina quinasa de insulina (izquierda) y de IGF-1 (derecha). Adaptado de Laron, 2001.

5.4. Insulina e IGF-1 en el cerebro

En un principio se pensaba que el cerebro era insensible a la insulina y al IGF-1, sin embargo, desde hace más de una década se ha puesto de manifiesto su posible intervención en la captura y regulación de la glucosa por parte de las células cerebrales (Hernández et al., 2016; Jagua et al., 2008). No obstante, no se ha corroborado el origen de la insulina cerebral que, aunque lo más aceptado en la actualidad es que su origen es pancreático y es transportada al cerebro a través de la barrera hematoencefálica, todavía se pone en duda una posible síntesis de ésta en el cerebro (Hernández, 2014; Jagua et al., 2008). En cambio, sí se conoce que el IGF-1 es producido en el cerebro, aunque también hay transporte de éste a través de la barrera hematoencefálica. Ambos atraviesan la barrera desde los capilares sanguíneos hasta el parénquima cerebral con la ayuda de sus respectivos receptores (García-Cáceres et al., 2016; Hernández, 2014). Una vez en el cerebro, se unen a su receptor presentes en neuronas y astrocitos. Esto produce la autofosforilación de las subunidades beta, dotando al receptor con la capacidad de fosforilar a otras proteínas. Una de estas proteínas es IRS (sustrato del receptor de insulina) y hay 6 tipos, de los cuales los más importantes son IRS-1 y IRS-2 que se encargan de activar la vía de señalización de PI3K/Akt. Una de sus funciones se encarga de translocar el transportador GLUT1, que se encuentra en vesículas en el interior de los astrocitos, a la membrana, para así transportar glucosa al interior de las células (Fernández et al., 2017; García-Cáceres et al., 2016; Hernández, 2014; Hernández et al., 2016; Jagua et al., 2008).

6. Hiperglucemia

Cuando se ingiere glucosa se absorbe al torrente sanguíneo durante la digestión, para luego pasar a las células donde será metabolizada. Sin embargo, cuando la concentración de glucosa en sangre aumenta superando los niveles normales, se produce una hiperglucemia. Este desajuste puede darse en un momento puntual o ser crónico y puede producirse por diferentes motivos como deficiencia de insulina, resistencia a la insulina, mala dieta combinado con escaso o nulo ejercicio, estrés, etc. Por ello, está estrechamente relacionada con enfermedades como la obesidad y la diabetes mellitus.

De igual forma, un exceso de glucosa en sangre puede producir un exceso de glucosa en el cerebro que dañe las células y afecte negativamente a su funcionamiento, por eso la hiperglucemia también puede estar relacionada con enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (Mestizo-Gutiérrez et al., 2014; Vicent et al., 2005).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Por tanto, la hipótesis principal que se plantea en este trabajo es que la insulina y el IGF-1 tienen un papel importante para que los astrocitos puedan metabolizar la glucosa y mantener la función neuronal cuando se dan condiciones de hiperglucemia. Para ello, se han establecido los siguientes objetivos:

1. Estudiar el efecto que tiene la hiperglucemia sobre la actividad neuronal

- Establecer el efecto que tiene el aumento de la concentración normal de glucosa en el cerebro sobre la transmisión sináptica y la actividad neuronal.
- Determinar la capacidad que tienen las neuronas de recuperar su actividad basal al volver a la concentración normal de glucosa.

2. Investigar el papel de los receptores de insulina e IGF-1 astrocitarios en la actividad neuronal en condiciones de hiperglucemia

- Establecer el papel que tiene el receptor de insulina en la regulación de glucosa por parte de los astrocitos en condiciones de hiperglucemia, y su efecto en la transmisión sináptica y la actividad neuronal.
- Determinar la función del receptor de IGF-1 en la regulación de glucosa por parte de los astrocitos en condiciones de hiperglucemia, y su efecto sobre la transmisión sináptica y la actividad neuronal.
- Estudiar la diferencia que existe entre los receptores de insulina y los receptores de IGF-1 en la regulación de glucosa en astrocitos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales de experimentación

El modelo animal que se ha empleado para los experimentos es el ratón de la cepa C57BLACK6, adultos de entre 3 y 5 meses de edad, tanto hembras como machos. Se han utilizado ratones de tres tipos: ratones salvajes (wild type, WT) que se han utilizado como control, ratones knockout (KO) para el receptor de insulina en astrocitos y ratones knockout para el receptor de IGF-1 en astrocitos. Todos los ratones han sido cedidos por el animalario del Instituto Cajal y los protocolos experimentales se han realizado según la normativa estipulada por el comité de bioética del CSIC.

2. Líquido cefalorraquídeo artificial

Se prepara un litro de solución de líquido cefalorraquídeo artificial (LCFA) que contiene cloruro sódico (NaCl) a 124 mM, cloruro potásico (KCl) a 2.69 mM, fosfato monopotásico (KH_2PO_4) a 1.25 mM, sulfato magnésico (MgSO_4) a 2 mM, bicarbonato sódico (NaHCO_3) a 26 mM, cloruro cálcico (CaCl_2) a 2 mM y glucosa a 10 mM y ajustado a un pH 7.4.

3. Obtención de rodajas de cerebro

El ratón se sacrifica por decapitación (proceso llevado a cabo por expertos cualificados), luego se corta y se abre el cráneo con la ayuda de unas tijeras y unas pinzas y se extrae el encéfalo (durante todo el proceso se suministra LCFA enfriado a una temperatura inferior a 4°C). Una vez extraído, se le quita el cerebelo y la corteza prefrontal con una cuchilla y se pega a la placa del vibrátomo (Vibratome 3000) con la parte caudal hacia arriba, se sumerge en LCFA frío (inferior a 4°C) y oxigenado con gas carbógeno (95% O_2 y 5% CO_2) y se hacen cortes transversales obteniendo rodajas de hipocampo con un grosor de 350 μm . Luego se separan los hemisferios y se incuban durante una hora en LCFA a temperatura ambiente (21-24°C) y barbotando constantemente con carbógeno.

4. Registros electrofisiológicos

Tras el período de incubación, las rodajas de cerebro se transfieren a la cámara de registro y se perfunden con LCFA burbujeado con carbógeno a un flujo constante de 2 mL/min, manteniendo un volumen de 200 μL . Se registra la espiga poblacional de campo (fPS, del inglés field

Population Spike; **Figura 13**) en la capa piramidal de la región de CA1 del hipocampo, posicionando un microelectrodo de registro de fibra de carbono (Carbostar-1, Kation Scientific, Minneapolis, USA) conectado a un amplificador (AC/DC Differential Amplifier 3000, A-M Systems, USA) y a un filtro activo de 50-60Hz (HumBug, Quest Scientific, Canadá). La señal de registro se digitaliza a través de un sistema de adquisición de datos (Clampex 10.2, Molecular Device, CA, USA) conectado a un ordenador personal, donde se visualiza y almacena mediante el paquete de programas Clampex 10.2 (Molecular Device). Las fPS se obtienen al estimular las fibras colaterales de Schaffer con un electrodo bipolar de tungsteno (distancia interelectródica 90-125 μm) posicionado en el *stratum radiatum*. Se aplican pulsos de estimulación monofásicos de 50 μs de duración a distintas intensidades a través de una unidad de aislamiento acoplada a un estimulador (Isolated Pulse Stimulator, Model 2100, A-M SYSTEM, Carlsborg, WA, USA) comandado a través del propio sistema de adquisición de datos (**Figura 14**).

Se realizan varios registros de la fPS cambiando las concentraciones de glucosa del LCRA con el que se perfunde la rodaja. Primero se realiza un registro basal de al menos 10 minutos con una concentración normal de glucosa (10 mM). Luego se cambia la concentración de glucosa de 10 a 20 mM (hiperglucemia) y se registra alrededor de otros 10 minutos. El proceso se repite de nuevo cambiando la concentración de 20 a 10 mM, luego se sube a 40 mM (hiperglucemia más intensa) y finalmente se baja otra vez a 10 mM, cada cambio de concentración se registra al menos durante 10 minutos. Por tanto, por cada rodaja de cerebro se obtienen 5 registros (10 mM, 20 mM, 10 mM, 40 mM y 10 mM). Estos registros se realizan en los ratones control, los ratones KO para receptores de insulina y los ratones KO para receptores de IGF-1.

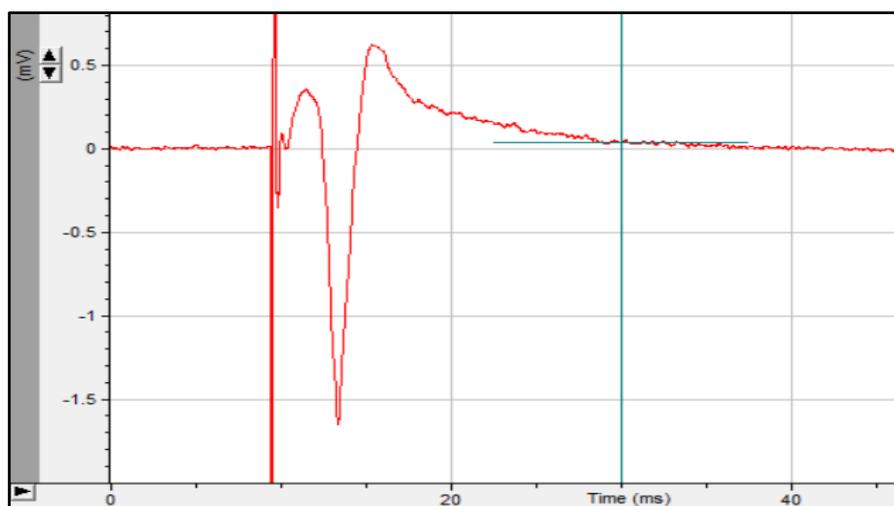


Figura 13. Espiga poblacional de campo (mV) obtenida en una de las rodajas de ratón. Registrado con el programa Clampex 10.2 y analizado con el programa Clampfit 10.2.

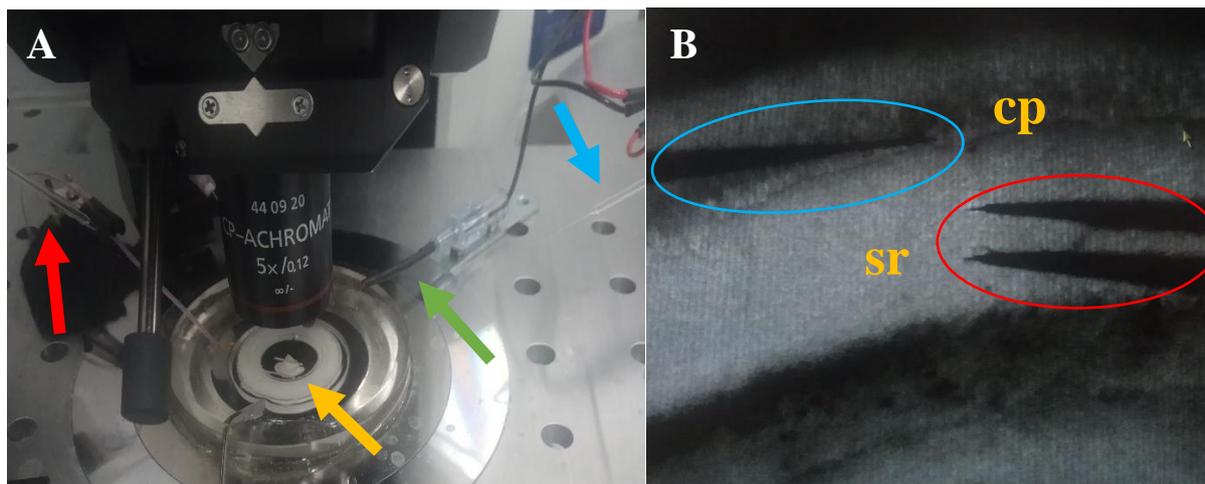


Figura 14. (A) Rodaja de ratón en la cámara de inmersión para registro: rodaja (flecha amarilla), electrodo de estimulación (flecha roja), electrodo de registro (flecha azul) y electrodo de tierra (flecha verde). (B) Rodaja vista al microscopio, se puede observar la región CA1 del hipocampo con el electrodo de estimulación (rojo) colocado en el *stratum radiatum* (sr) y el de registro (azul) en la capa piramidal (cp).

5. Análisis estadísticos

Se ha utilizado el programa Clampfit 10.2 para medir la amplitud de los fPS expresadas en mV. Posteriormente, la media de las amplitudes del registro basal (primer registro con glucosa 10 mM) se toma como 100 % y las demás amplitudes (correspondientes a los registros de 20 mM, 10 mM, 40 mM y 10 mM) se expresan como porcentajes de cambio con respecto a la media basal. Estos porcentajes se presentan como las medias \pm el error estándar (SEM) o \pm la desviación estándar (SD) de todos los registros obtenidos para cada tipo de ratón (control, KO para receptores de insulina y KO para receptores de IGF-1) y para cada condición experimental (basal (que será el 100 %), 20 mM, 10 mM, 40 mM y 10 mM).

Todos los análisis estadísticos y los gráficos presentados se han obtenido con el programa GraphPad Prism 7. Se ha realizado la prueba t de Student para muestras relacionadas para comparar (en los tres tipos de ratón) las medias obtenidas en cada condición experimental (20 mM, 10 mM, 40 mM y 10 mM) con la condición basal, y la prueba t de Student para muestras independientes para comparar las medias de los registros control con los registros KO para receptores de insulina y con los registros KO para receptores de IGF-1. Los niveles de significación empleados han sido: * $p < 0,05$ (diferencias poco significativas), ** $p < 0,01$ (diferencias significativas) y *** $p < 0,001$ (diferencias muy significativas).

RESULTADOS

De los experimentos se han obtenido 13 registros de 4 ratones control, 10 registros de 3 ratones knockout para receptor de insulina en astrocitos (KO IR) y 7 registros de 3 ratones knockout para receptor de IGF-1 (KO IGF-1R) (Tabla 1).

Tabla 1. Ratones utilizados para los experimentos incluyendo su sexo, su edad, el número de registros conseguidos por cada animal y el número total de registros por tipo de ratón.

Tipo de ratón	Ratones	Sexo	Edad	Registros	n total
Control	Ratón 1	Macho	5 meses	3	13
	Ratón 2	Macho	3 meses	5	
	Ratón 3	Hembra	3 meses	3	
	Ratón 4	Macho	3 meses	2	
KO IR	Ratón 1	Hembra	5 meses	5	10
	Ratón 2	Hembra	5 meses	3	
	Ratón 3	Macho	5 meses	2	
KO IGF-1R	Ratón 1	Hembra	3 meses	2	7
	Ratón 2	Macho	3 meses	3	
	Ratón 3	Macho	3 meses	2	

1. Efecto de la hiperglucemia sobre la transmisión sináptica y la actividad neuronal.

Para determinar el efecto que tiene un aumento de glucosa sobre la transmisión sináptica y la actividad neuronal se han analizado los 13 registros control, estudiando el cambio que puede sufrir la amplitud del fPS a lo largo del proceso experimental con respecto a la condición basal (Figura 15A).

Estudiando las medias de los 13 registros control se pudo observar una disminución de la amplitud del fPS en proporción al aumento de glucosa. Es decir, a mayor concentración de glucosa mayor es la reducción de la amplitud de la fPS. Sin embargo, esta reducción no es muy apreciable con la concentración de glucosa de 20 mM, siendo menor del 5 % (Tabla 2).

Tabla 2. Media y error estándar (SEM) de los cambios de amplitud de la fPS de los 13 registros control en cada condición experimental.

Concentración de glucosa	Basal	20 mM	10 mM	40 mM	10 mM
Cambios en la amplitud de la fPS (%)	100	96,22 ± 1,19	98,14 ± 1,97	84,76 ± 2,57	89,19 ± 3,24

No obstante, se ha realizado una prueba t de Student en la que se ha comparado el registro basal (registro inicial con glucosa a 10 mM) con cada condición experimental (concentración de glucosa a 20 mM, 10 mM, 40 mM y 10 mM) para determinar si estos cambios en la fPS son significativos.

Los resultados obtenidos con la prueba t de Student demuestran que las reducciones de la amplitud del fPS en las dos fases de hiperglucemia son significativas, siendo menos significativa con el aumento de glucosa a 20 mM (* $p < 0,05$; **Figura 15B**) y más significativa con 40 mM (** $p < 0,01$; **Figura 15B**). También se puede observar que la diferencia entre el basal y la primera reducción a 10 mM (primera fase de recuperación) no es significativa. Esto podría deberse a que se recupera la actividad neuronal inicial, posiblemente debido a que la concentración de glucosa añadida anteriormente (20 mM) no es tan alta como para producir un descenso tan notable en la actividad que posteriormente no se pueda recuperar. Sin embargo, si existe diferencia significativa entre la amplitud del fPS de la segunda fase de recuperación y el basal (** $p < 0,01$; **Figura 15B**). Esto se debe a que las neuronas, aunque sí recuperan actividad, no llega hasta su valor inicial, tal vez porque una concentración muy elevada de glucosa (40 mM) produce tal descenso en la actividad que es difícil de recuperar hasta los valores iniciales.

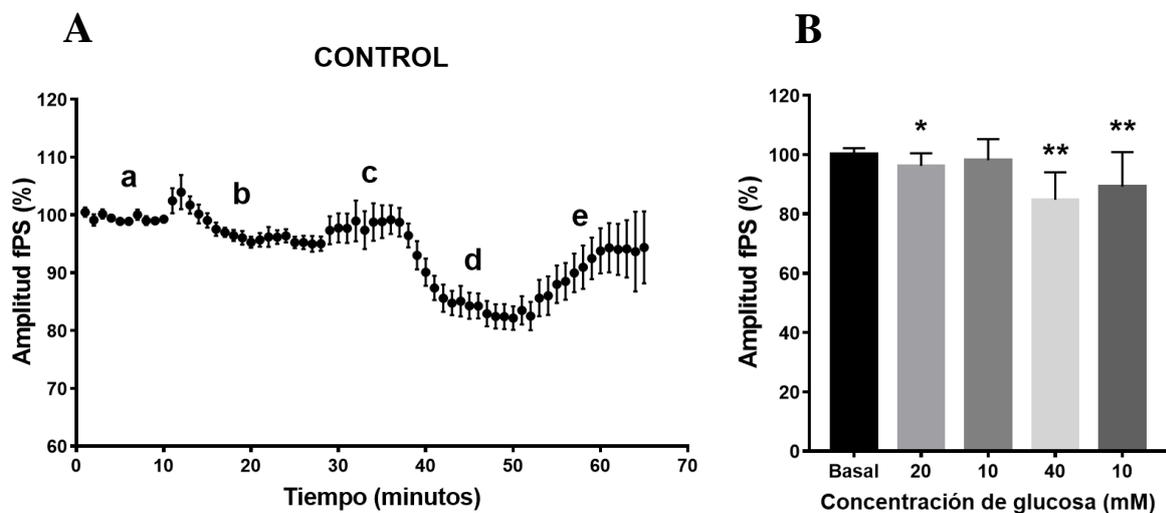


Figura 15. (A) Gráfica lineal donde se representa la evolución temporal de los cambios de amplitud del fPS debido a las distintas concentraciones de glucosa: condición basal con concentración de glucosa 10 mM (a), primera condición de hiperglucemia con glucosa 20 mM (b), fase de recuperación reduciendo la glucosa nuevamente a 10 mM (c), segunda condición de hiperglucemia con glucosa 40 mM (d), y última fase de recuperación reduciendo de nuevo la concentración a 10 mM (e). Se representan las medias de los 13 registros control más el SEM. (B) Histograma que muestra los cambios de amplitud del fPS en cada condición experimental. Se representa la media de los 13 registros control con la SD en cada condición experimental.

2. Importancia de los astrocitos, la insulina y el IGF-1 en la transmisión sináptica y la actividad neuronal durante la hiperglucemia

Para determinar la importancia que tienen los astrocitos, la insulina y el IGF-1 en la regulación de la transmisión sináptica y la actividad neuronal en distintas condiciones de hiperglucemia, se ha estudiado el papel que desempeñan los receptores de insulina y de IGF-1 astrocitarios en la obtención de glucosa durante estas condiciones. Para ello, se han analizado los cambios de amplitud de la fPS en los registros KO IR (n = 10) y en los KO IGF-1R (n = 7) obtenidos con el mismo proceso experimental de cambiar las concentraciones de glucosa (basal, 20 mM, 10 mM, 40 mM y 10 Mm). Posteriormente se han comparado con los registros control.

2.1. Efecto de la hiperglucemia sobre la transmisión sináptica y la actividad neuronal en ratones deficientes en receptores de insulina astrocitarios

Observando las medias de los 10 registros KO IR se puede apreciar que, al igual que sucede con los registros control, también se produce una reducción de la fPS en proporción al aumento de glucosa, pero esta reducción es más notoria que en los controles (**Tabla 3 y Figura 16A**).

Tabla 3. Media y error estándar (SEM) de los cambios de amplitud de la fPS de los 10 registros KO IR en cada condición experimental.

Concentración de glucosa	Basal	20 mM	10 mM	40 mM	10 mM
Cambios en la amplitud de la fPS (%)	100	89,26 ± 4,32	94,25 ± 3,61	72,90 ± 3,22	82,64 ± 4,85

De igual forma, se ha realizado una prueba t de Student, en la que se ha comparado el registro basal con cada condición experimental, para comprobar si esta disminución de la fPS es significativa. El análisis estadístico confirma que los cambios producidos en la fPS en las fases de hiperglucemia son significativos (**Figura 16B**). Menos significativos a una concentración 20 mM (*p < 0,05; **Figura 16B**) y bastante más significativos con glucosa 40 mM (***p < 0,001; **Figura 16B**). No obstante, los cambios en la fPS durante la primera fase de recuperación no son significativos, por lo que es posible que las neuronas recuperen actividad acercándose a los valores iniciales. Del mismo modo que con los registros control, el aumento que sufre la amplitud del fPS en la segunda fase de recuperación con respecto a la condición de 40 mM no es suficiente para recuperar la actividad basal, lo que también da lugar a diferencias significativas (**p < 0,01).

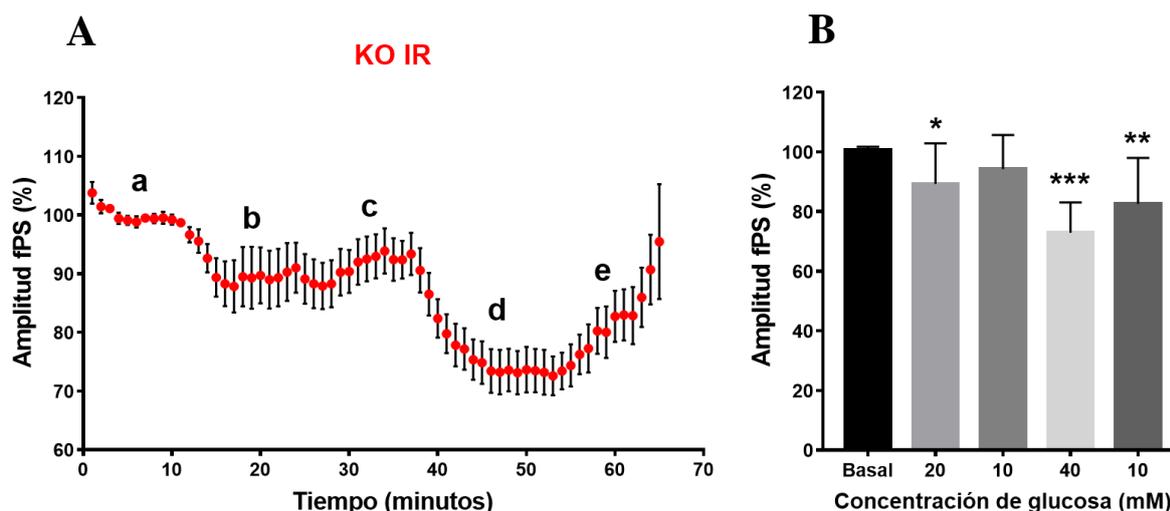


Figura 16. (A) Gráfica lineal donde se representa la evolución temporal de los cambios de amplitud del fPS debido a las distintas concentraciones de glucosa: condición basal con concentración de glucosa 10 mM (a), primera condición de hiperglucemia con glucosa 20 mM (b), fase de recuperación reduciendo la glucosa nuevamente a 10 mM (c), segunda condición de hiperglucemia con glucosa 40 mM (d) y última fase de recuperación reduciendo de nuevo la concentración a 10 mM (e). Se representan las medias de los 10 registros KO IR más el SEM. (B) Histograma que muestra los cambios de amplitud del fPS en cada condición experimental. Se representa la media de los 13 registros KO IR con la SD en cada condición experimental.

2.2. Efecto de la hiperglucemia sobre la transmisión sináptica y la actividad neuronal en ratones deficientes en receptores de IGF-1 astrocitarios

Las medias de los 7 registros KO IGF-1R también muestran una disminución de la fPS al aumentar la concentración de glucosa. No obstante, esta disminución es mayor que en los registros control pero menor que en los registros KO IR. Además, a diferencia de los otros registros, éstos presentan un aumento más considerable de la fPS en las fases de recuperación, sobre todo en la primera, la cual supera la actividad neuronal basal (**Tabla 4 y Figura 17A**).

Tabla 4. Media y error estándar (SEM) de los cambios de amplitud de la fPS de los 7 registros KO IGF-1R en cada condición experimental.

Concentración de glucosa	Basal	20 mM	10 mM	40 mM	10 mM
Cambios en la amplitud de la fPS (%)	100	94,50 ± 5,33	105,34 ± 4,11	79,99 ± 6,32	95,34 ± 7,04

Con los resultados de la prueba t de Student se puede apreciar que solo la condición de hiperglucemia intensa (40 mM) muestra diferencias significativas con respecto al basal (**Figura 17B**). Aunque la disminución de la fPS durante las dos fases de hiperglucemia es más notoria

que en los registros control, los resultados de la primera fase de hiperglucemia (20 mM) no son significativos (**Figura 17B**) y los de la segunda (40 mM) tienen un nivel bajo de significancia (* $p < 0,05$; **Figura 17B**). Sin embargo, no se puede descartar que esta falta de significancia se deba al pequeño tamaño de la muestra ($n = 7$) y a su gran desviación estándar (SD).

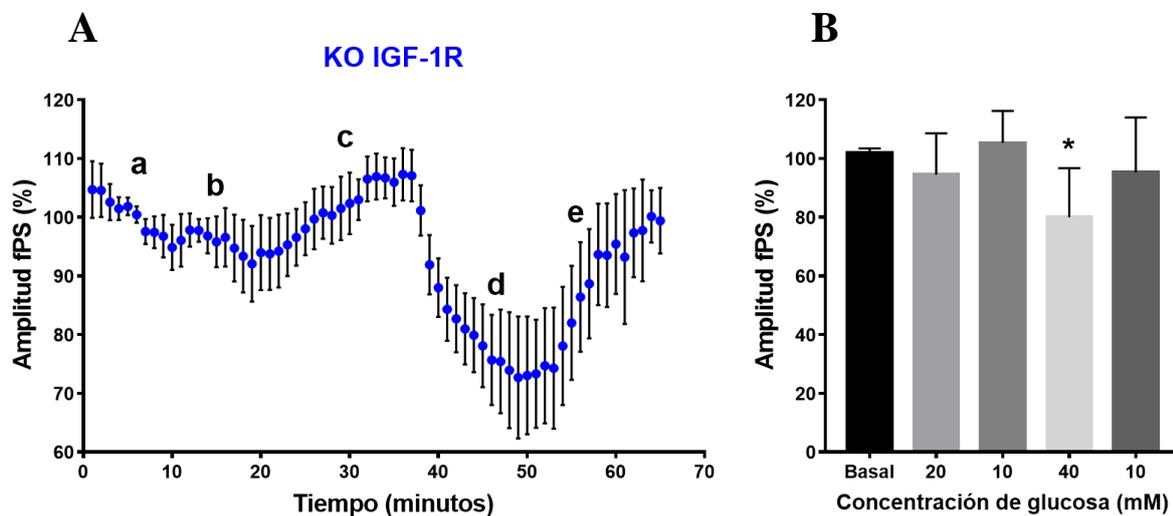


Figura 17. (A) Gráfica lineal donde se representa la evolución temporal de los cambios de amplitud del fPS debido a las distintas concentraciones de glucosa: condición basal con concentración de glucosa 10 mM (a), primera condición de hiperglucemia con glucosa 20 mM (b), fase de recuperación reduciendo la glucosa nuevamente a 10 mM (c), segunda condición de hiperglucemia con glucosa 40 mM (d), y última fase de recuperación reduciendo de nuevo la concentración a 10 mM (e). Se representan las medias de los 7 registros KO IGF-1R más el SEM. (B) Histograma que muestra los cambios de amplitud del fPS en cada condición experimental. Se representa la media de los 7 registros KO IGF-1R con la SD en cada condición experimental.

2.3. Papel de los receptores de insulina y de IGF-1 en astrocitos para mantener la transmisión sináptica y la actividad neuronal durante la hiperglucemia

Para determinar si los receptores de insulina y los receptores de IGF-1 contribuyen a regular la concentración de glucosa en condiciones de hiperglucemia por los astrocitos (evitando así que ésta intervenga negativamente en la función neuronal) se han comparado los cambios que sufre la fPS en los registros KO IR y en los registros KO IGF-1R con los cambios que sufre la fPS en los registros control.

Observando las medias se puede apreciar que durante las dos fases de hiperglucemia (20 mM y 40 mM) la reducción de la fPS es mayor en los registros KO IR, luego en los registros KO IGF-1R y por último en los registros control (**Tabla 5 y Figura 18**).

Tabla 5. Media y error estándar (SEM) de los cambios de amplitud de la fPS de los 13 registros control, de los 10 registros KO IR y de los 7 registros KO IGF-1R en cada condición experimental.

Concentración de glucosa		20 mM	10 mM	40 mM	10 mM
Cambios en la amplitud de la fPS (%)	Control	96,22 ± 1,19	98,14 ± 1,97	84,76 ± 2,57	89,19 ± 3,24
	KO IR	89,26 ± 4,32	94,25 ± 3,61	72,90 ± 3,22	82,64 ± 4,85
	KO IGF-1R	94,50 ± 5,33	105,34 ± 4,1	79,99 ± 6,32	95,34 ± 7,04

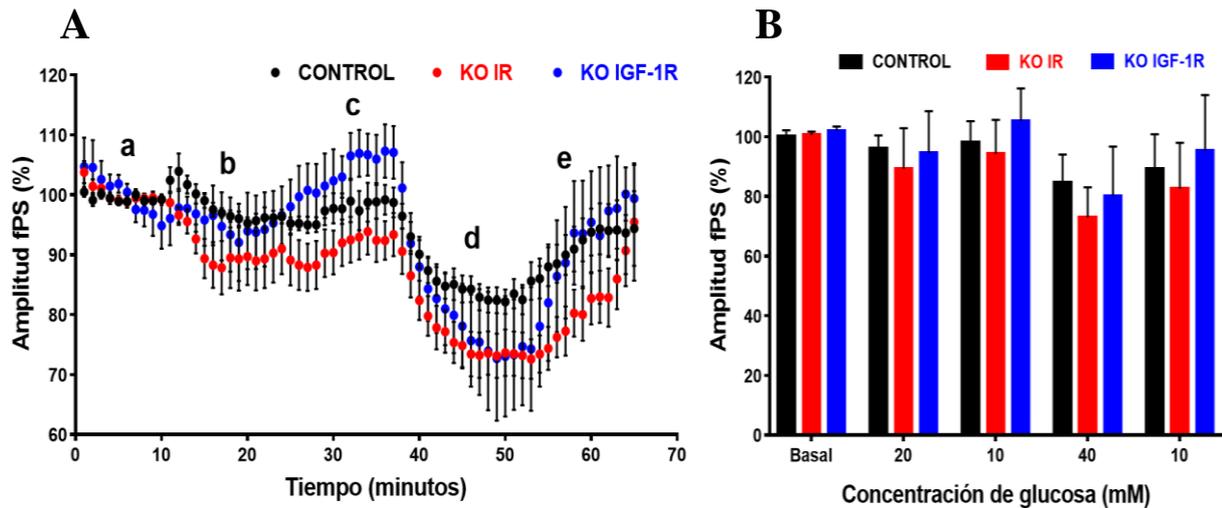


Figura 18. (A) Gráfica lineal de la media más el SEM de los 13 registros control (negro), los 10 registros KO IR (rojo) y los 7 registros KO IGF-1R (azul), donde se representa la evolución temporal de los cambios de amplitud del fPS debido a las distintas concentraciones de glucosa: condición basal con concentración de glucosa 10 mM (a), primera condición de hiperglucemia con glucosa 20 mM (b), fase de recuperación reduciendo la glucosa nuevamente a 10 mM (c), segunda condición de hiperglucemia con glucosa 40 mM (d), y última fase de recuperación reduciendo de nuevo la concentración a 10 mM (e). (B) Histogramas que muestran los cambios de amplitud de la fPS. Se representa la media de los 3 tipos de registros con la SD en cada condición experimental.

Para determinar si estas diferencias son significativas se han realizado varias pruebas t de Student para comparar las medias entre registros en cada condición experimental (**Figura 19**). Con los datos obtenidos del análisis estadístico entre los registros control y los registros KO IR se observa que solo en la condición de hiperglucemia intensa (glucosa 40 mM) existen diferencias significativas (**p < 0,01; **Figura 19A**). Por lo que es posible que los receptores de insulina intervengan en la regulación de los niveles de glucosa por los astrocitos, para evitar que una saturación de ésta en el cerebro interfiera negativamente en la función neuronal. Sin embargo, a pesar de que la reducción de la fPS durante la concentración de 20 mM también es mayor en los registros KO IR con respecto a los controles, no es significativa. Este hecho podría explicarse debido a una alta SD y a una insuficiente n que impide descartar que esta mayor reducción en la fPS se deba a un proceso aleatorio. No obstante, también podría deberse a que

los astrocitos no solo capturan glucosa mediante insulina, por lo que en una condición de hiperglucemia moderada (20 mM), éstos serían capaces de incorporar glucosa mediante otros métodos prescindiendo de la insulina pero teniendo la misma eficacia. Pero cuando la saturación de glucosa es demasiado alta (40 mM) no serían capaces de regular tal proceso sin la insulina. Comparando los cambios que sufre la fPS en los registros KO IGF-1R con los registros control, no se observan diferencias significativas para ninguna de las condiciones experimentales (**Figura 19B**). Sin embargo, no se puede afirmar si este hecho se debe a que los receptores de IGF-1 no intervienen en regular los niveles de glucosa cuando sucede una saturación (por lo que la disminución de la transmisión sináptica sería la misma en animales salvajes y animales deficientes en receptores de IGF-1 astrocitarios) o, por el contrario, se debe a la pequeña n y a la alta SD. Así mismo, tampoco se puede establecer si los receptores de insulina y de IGF-1 tienen la misma importancia o se comporten de igual forma ante condiciones de hiperglucemia. Ya que, aunque los análisis estadísticos muestran que no hay diferencias significativas entre ellos, tampoco se puede descartar que se deba a la n y a la SD (**Figura 19C**).

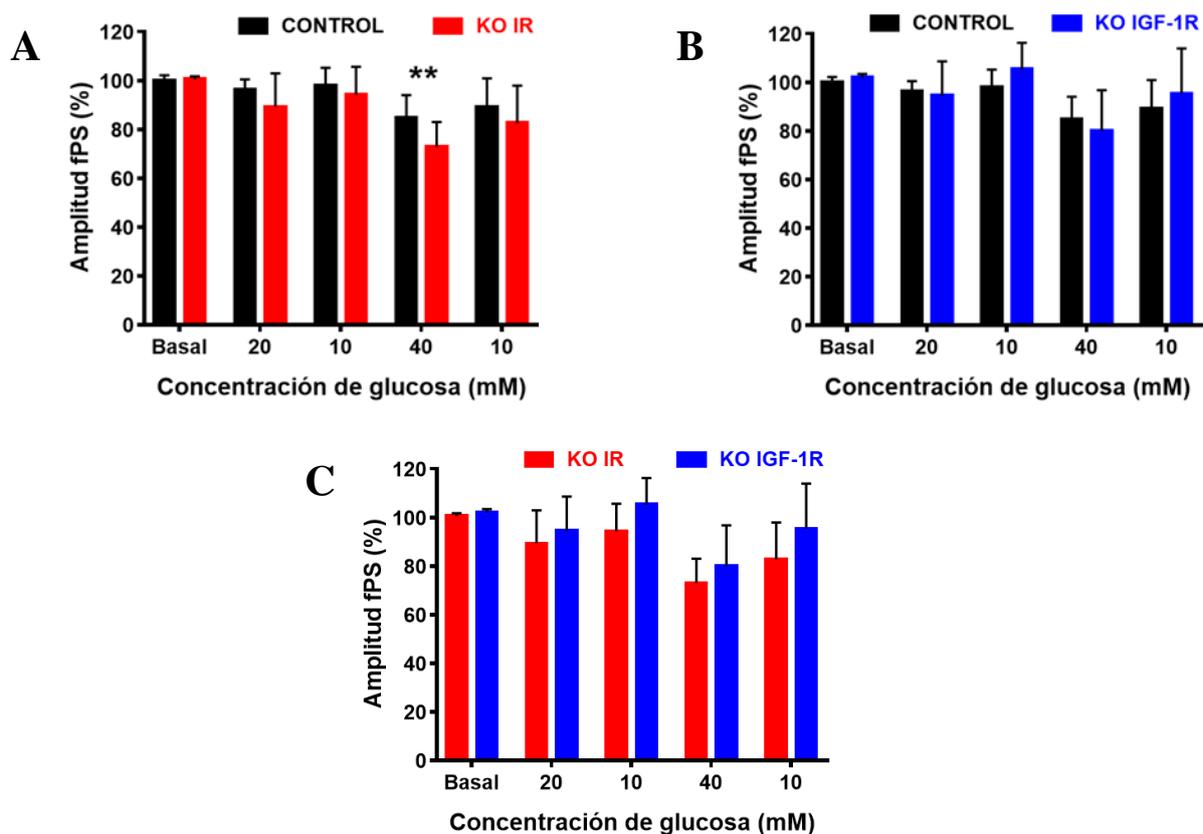


Figura 19. Histogramas que muestran los cambios de amplitud de la fPS en cada condición experimental. Se representa la media de los registros con la SD en cada condición experimental. (A) Registros control (negro) y registros KO IR (rojo). (B) Registros control (negro) y registros KO IGF-1R (azul). (C) Registros KO IR (rojo) y los registros KO IGF-1R (azul).

DISCUSIÓN

El cerebro es el órgano con mayor gasto energético debido a su alta actividad. Para ello, las neuronas utilizan la glucosa como principal sustrato para generar energía en forma de ATP que emplearán para mantener sus funciones. Además, la glucosa es precursora de ciertos neurotransmisores como glutamato, GABA y acetilcolina, liberados por las neuronas en la transmisión sináptica, y también es el principal nutriente para otras células nerviosas como los astrocitos (Jaramillo-Magaña, 2013).

1. Consecuencias de la hiperglucemia sobre la función neuronal

Mediante los experimentos realizados y los resultados obtenidos se ha podido observar que una condición de hiperglucemia en el cerebro, es decir, un aumento en la concentración de glucosa cerebral, disminuye la actividad neuronal. Además, esta disminución es concentración-dependiente, de manera que cuanta más glucosa hay en el tejido cerebral, más disminuye la actividad neuronal. En una primera estimación estos resultados podrían considerarse contradictorios, ya que se podría esperar que una hiperglucemia aumentase la actividad neuronal. Pues si se produce un aumento en la concentración de glucosa cerebral, las neuronas generarían más energía en forma de ATP, este incremento modificaría la apertura de los canales de potasio dependientes de ATP, lo que aumentaría la transmisión y propagación sináptica volviendo a las neuronas más excitables (Chavarría Marqués, 2017). Tal vez, este hecho podría suceder si el incremento de glucosa fuera pequeño, generando una condición de hiperglucemia que fuera tolerable por las neuronas.

Sin embargo, en el caso de los experimentos realizados, hay que tener en cuenta que las condiciones de hiperglucemia a las que se ha sometido a las neuronas son muy altas, aumentando hasta dos y cuatro veces más la concentración normal de glucosa. Por lo tanto, tal exceso de glucosa no aumenta la actividad neuronal, sino que la disminuye. Esto se debe a que cuando se dan condiciones altas de hiperglucemia, se generan más especies reactivas de oxígeno (ROS) procedentes de los procesos metabólicos de la glucosa, este exceso de ROS escapa al control del sistema antioxidante y se acumula rompiendo el equilibrio y generando estrés oxidativo. El estrés oxidativo produce daño neuronal que afecta al correcto funcionamiento de la sinapsis y puede producir apoptosis, disminuyendo así la transmisión sináptica y la actividad neuronal (Díaz-Flores et al., 2004; Russell et al., 2002; Vicent, et al., 2005; Zhrebetskaya et al., 2009).

No obstante, esta pérdida de actividad neuronal no solo está vinculada a la concentración de glucosa, sino también al tiempo de exposición en estas condiciones. Cuanto más tiempo se expone a las neuronas a condiciones de hiperglucemia, mayor será la pérdida de actividad neuronal, hasta llegar al punto donde se estabilice o se pierda por completo (dependiendo de la cantidad de glucosa añadida). Además, estos dos factores no solo afectan al período de hiperglucemia, sino que también marcan la recuperación neuronal tras volver a un estado normal de glucemia. Por lo que cuanto menor es la hiperglucemia y el tiempo de exposición, menor será el daño inducido a las neuronas (pudiendo ser reversible) y mayor la capacidad de éstas para recuperar la actividad perdida. Pero si la hiperglucemia es intensa y el tiempo de exposición prolongado, entonces el daño inducido puede ser irreversible, provocando que las neuronas recuperen poca actividad sin llegar a la basal o no recuperen actividad.

Sin embargo, las neuronas no son las únicas células cerebrales implicadas en el metabolismo de la glucosa. Gran parte es capturada por los astrocitos y es degradada a lactato mediante la glucólisis o almacenada como glucógeno. Además, la captura de glucosa por astrocitos puede estar estrechamente relacionada con la insulina y el IGF-1 (Fernández et al., 2017).

2. La importancia de la insulina en el metabolismo de glucosa por parte de los astrocitos

Con los experimentos se ha podido observar que, en mismas condiciones de hiperglucemia, las neuronas de ratones con astrocitos deficientes en receptores de insulina sufren una pérdida mayor de actividad que aquellas neuronas de ratones salvajes. Estos resultados ponen de manifiesto dos hechos.

Primero, la importancia que tienen los astrocitos en regular la concentración de glucosa cuando se dan condiciones de hiperglucemia, lo que puede poner en riesgo a las neuronas como se ha mencionado anteriormente. Por tanto, los astrocitos capturarían glucosa para almacenarla en forma de glucógeno e intentar amortiguar la hiperglucemia y en consecuencia el estrés oxidativo (De la Fuente Martín, 2011).

En segundo lugar, la importancia que tiene la insulina para estimular la captura de glucosa por los astrocitos, ya que la insulina, mediante la unión a su receptor, activa la ruta de señalización que recluta al transportador GLUT1, para que éste se una a la membrana celular y así la glucosa pueda difundir al interior del astrocito (García-Cáceres et al., 2016; Hernández, 2014). Pero si está inhibida la expresión de los receptores de insulina entonces ésta no puede actuar, por lo que GLUT1 no se transloca a la membrana y la glucosa no puede difundir. Por tanto, esto explicaría el incremento en la pérdida de la actividad neuronal, pues los astrocitos, al no poder

incorporar glucosa mediante la acción de la insulina, no podrían poner en marcha mecanismos compensatorios durante la hiperglucemia, produciendo que aumente el estrés oxidativo y en consecuencia el daño neuronal.

De la misma manera que aumenta la pérdida de actividad, también es menor su capacidad de recuperación en las fases en las que se vuelve a concentraciones normales de glucosa. Hecho que tiene sentido, ya que, si el daño a las neuronas es mayor y desciende más su actividad, éstas tendrían menos capacidad para recuperarla.

También hay que tener en cuenta que, aunque los datos muestran mayor reducción en la actividad neuronal para la primera condición de hiperglucemia (la menos intensa), no fue una diferencia significativa. Una explicación viable podría ser que los astrocitos no solo incorporan glucosa mediante la actuación de la insulina, sino que pueden también emplear otros métodos como reclutar a GLUT1 de manera independiente (Hernández, 2014). Esto resultaría en una escasa incorporación de glucosa, pero tal vez lo suficiente para amortiguar una hiperglucemia que no es muy intensa. Aun así, esto no pasaría en una hiperglucemia mayor ya que los astrocitos no podrían soportar tal saturación de glucosa sin la insulina. Sin embargo, esta explicación no puede afirmarse, sin un mayor número de muestras para descartar que se deba a un proceso aleatorio.

Por último, comentar que en ausencia de receptores de insulina, tal vez ésta podría unirse a los receptores de IGF-1 debido al enorme parecido que comparten ambas hormonas, no obstante la afinidad de la insulina por el receptor de IGF-1 es extremadamente baja, por lo que no sería suficiente para que la insulina pudiera actuar.

3. La importancia del IGF-1 en el metabolismo de glucosa por parte de los astrocitos

Los resultados relacionados con IGF-1 han sido los menos esclarecedores, seguramente por el pequeño tamaño muestral y la gran dispersión de las muestras. No obstante, se puede observar que, en mismas condiciones de hiperglucemia, se produce una mayor pérdida de actividad neuronal en los ratones con astrocitos deficientes en receptores de IGF-1 que en los ratones salvajes, pero esta diferencia no es significativa. También se puede ver que la pérdida de actividad es menor que en los ratones con astrocitos deficientes en receptores de insulina, pero tampoco es significativa. Esto podría deberse a tres razones.

En primer lugar, el IGF-1 no estaría tan involucrado en la captura de glucosa por parte de los astrocitos como lo está la insulina, por lo que su ausencia no afectaría a la regulación de la glucosa y por ello no existirían diferencias entre este grupo y los ratones salvajes. En este caso,

no se hubieran dado diferencias significativas con el grupo deficiente en receptores de insulina debido al pequeño tamaño muestral y a la gran dispersión de las muestras, pero que una vez se obtuvieran más registros, surgirían las diferencias significativas entre estos grupos (Hernández, 2014; Hernández et al., 2016).

En segundo lugar, el IGF-1 intervendría de la misma manera que la insulina en la captura de glucosa por parte de los astrocitos, por lo que su ausencia afectaría a la regulación de la glucosa y por ello no existirían diferencias entre este grupo y los ratones deficientes en receptores de insulina. Al igual que pasaba en el caso anterior, no se hubieran dado diferencias significativas con los ratones salvajes debido al pequeño tamaño muestral y a la gran dispersión de las muestras, pero que una vez se obtuvieran más registros, surgirían las diferencias significativas entre estos grupos (Hernández, 2014; Hernández et al., 2016).

En tercer lugar, el IGF-1 sí estaría involucrado en la captura de glucosa, pero no tanto como la insulina, por tanto, al encontrarse en valores intermedios, no presentaría diferencias significativas con ninguno de los otros dos grupos. En este caso, al aumentar el tamaño muestral podrían suceder dos situaciones, que siguiera sin haber diferencias o que surgieran diferencias significativas para ambos grupos. (Hernández, 2014; Hernández et al., 2016). No obstante, como se ha dicho anteriormente, no se podría descartar ninguna de estas tres hipótesis hasta que se obtuvieran más registros que permitieran determinar la correcta.

Otro detalle a tener en cuenta es que estos registros han sido los que más han aumentado su actividad neuronal durante las fases de recuperación, incluso llegando a superar la actividad inicial en el caso de la primera fase. Se necesitaría aumentar el tamaño muestral para descartar que se deba a un proceso aleatorio y si se descarta, entonces se debería proceder a realizar experimentos de otro tipo, pues este hecho escapa al alcance de este trabajo.

4. Implicaciones patológicas

Todos estos factores están estrechamente relacionados con enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (EA). Se ha incrementado la evidencia de que esta enfermedad puede estar asociada con alteraciones en la disponibilidad de glucosa en el cerebro, defectos en la liberación o señalización de insulina e IGF-1, aumento de las especies reactivas de oxígeno, aumento del estrés oxidativo y estimulación de la apoptosis (Mestizo-Gutiérrez, 2014). Por tanto, esto pone de manifiesto que, aunque la glucosa es esencial para el metabolismo cerebral, un exceso puede ser perjudicial, y que los astrocitos, la insulina y el IGF-1 son importantes para el metabolismo de la glucosa y mantener la actividad neuronal.

CONCLUSIONES

1. Un aumento de los niveles de glucosa en el cerebro produce una disminución de la transmisión sináptica y la actividad neuronal.
2. La pérdida de actividad neuronal aumenta a medida que se incrementa la concentración de glucosa y el tiempo de exposición a esta condición, pudiendo ser irreversible.
3. Las neuronas pueden recuperar su actividad al volver a condiciones normales de glucemia y depende del nivel de hiperglucemia al que han estado expuestas y la duración.
4. Durante condiciones de hiperglucemia, los astrocitos capturan glucosa para regular la concentración extracelular y amortiguar la hiperglucemia, intentado así reducir la pérdida de la función neuronal.
5. La insulina interviene en la captura y, por tanto, en el metabolismo de la glucosa por parte de los astrocitos, donde su importancia aumenta en condiciones de hiperglucemia, influyendo en la función neuronal.
6. El IGF-1 también puede tener un importante papel en la regulación del metabolismo de la glucosa por parte de los astrocitos.

Finalmente, comentar que para completar estos estudios se podrían realizar más experimentos, no solo para aumentar el tamaño muestral, sino también para profundizar más en algunos aspectos. Por ejemplo, obteniendo un número suficiente de muestras, se podrían separar por sexos, para observar las diferencias que pueda haber entre machos y hembras. Se podría aumentar el tiempo de exposición a la hiperglucemia o utilizar otras concentraciones de glucosa para comprobar cómo afecta a las neuronas. También se podría realizar el proceso inverso, sometiendo a las neuronas a una condición de hipoglucemia para observar cómo reaccionan éstas y los astrocitos ante una insuficiencia de glucosa.

BIBLIOGRAFÍA

- Albiñana Durá, E. (2014). *Efecto de colina sobre la excitabilidad neuronal y la transmisión sináptica en rodajas hipocámpales de roedores*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10486/661272>.
- Allen, N. y Barres, B. (2009). Glia - more than just brain glue. *Nature*, 457(7230): 675–677. doi: 10.1038/457675a.
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P. y Haydon, P. G. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends in Neurosciences*, 22(5): 208-215. doi: 10.1016/S0166-2236(98)01349-6.
- Brezar, V., Carel, J. C., Boitard, C. y Mallone, R. (2011). Beyond the hormone: insulin as an autoimmune target in type 1 diabetes. *Endocrine reviews*, 32(5): 623–669. doi: 10.1210/er.2011-0010.
- Chavarría Marqués, I. (2017). *Desarrollo de un software para el modelo de los efectos de la hiperglucemia en la actividad bioeléctrica del tejido nervioso del hipocampo*. Trabajo Fin de Grado. Universidad Politécnica de Valencia. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10251/85124>.
- Clemmons, D. R. (2007). Modifying IGF1 activity: an approach to treat endocrine disorders, atherosclerosis and cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6(10): 821–833. doi: 10.1038/nrd2359.
- Cornell-Bell, A. H., Finkbeiner, S. M., Cooper, M. S. y Smith, S. J. (1990). Glutamate Induces Calcium Waves in Cultured Astrocytes: Long-Range Glial Signaling. *Science*, 247(4941): 470-473. doi: 10.1126/science.1967852.
- Delafontaine, P., Song, Y. H. y Li, Y. (2004). Expression, regulation, and function of IGF-1, IGF-1R, and IGF-1 binding proteins in blood vessels. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 24(3): 435–444. doi: 10.1161/01.ATV.0000105902.89459.09.
- De la Fuente Martín, E. (2011). *Implicación de los astrocitos hipotalámicos en las alteraciones metabólicas y en los cambios de composición corporal inducidos por malnutrición en los periodos neonatal y adulto: nuevas acciones de la leptina y la ghrelina*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10486/7819>.
- De Luis, D. A. y Romero, E. (2012). Análogos de insulina: modificaciones en la estructura, consecuencias moleculares y metabólicas. *Semergen*, 39(1): 34-40. doi: 10.1016/j.semerg.2012.04.010.
- De Meyts, P. y Whittaker, J. (2002). Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design. *Nature Reviews Drug Discovery*, 1(10): 769–783. doi: 10.1038/nrd917.
- Díaz, D. P. y Burgos, L. C. (2002). ¿Cómo se transporta la glucosa a través de la membrana celular? *Iatreia*, 15(3): 179-189. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/26584202>.
- Díaz-Flores, M., Baiza-Gutman, L. A., Ibáñez-Hernández, M. A., Pascoe-Lira, D., Guzmán-Greenfel, A. M. y Kumate-Rodríguez, J. (2004). Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica. *Gaceta Médica De México*, 140(4): 437-447. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=5716>.
- Duque, J. E., Morales, G. y Duque, C. A. (1997). Las sinapsis. *Revista Medicina*, 19(2): 41-48. Disponible en: <https://revistamedicina.net/ojsanm/index.php/Medicina/article/view/46-6>.
- Escobar, A. y Gómez, B. (2008). Barrera hematoencefálica. Neurobiología, implicaciones clínicas y efectos del estrés sobre su desarrollo. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 9(5): 395-405. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=4435>.

- Fernández, A. M., Hernández, E., Pérez-Domper, P., Pérez-Álvarez, A., Mederos, S., Matsui, T., Santi, A., Trueba-Saiz, A., García-Guerra, L., Pose-Utrilla, J., Fielitz, J., Olson, E. N., Fernández de la Rosa, R., García, L., Pozo, M. A., Iglesias, T., Araque, A., Soya, H., Perea, G., Martín, E. D. y Torres-Alemán, I. (2017). Insulin Regulates Astrocytic Glucose Handling Through Cooperation With IGF-I. *Diabetes*, 66(1): 64–74. doi: 10.2337/db16-0861.
- Fernández Lamo, I. (2009). *Hipotiroidismo en el adulto: su influencia en la estructura y función de la formación hipocámpal de la rata*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10486/4046>.
- García-Cáceres, C., Quarta, C., Varela, L., Gao, Y., Gruber, T., Legutko, B., Jastroch, M., Johansson, P., Ninkovic, J., Yi, C. X., Le Thuc, O., Szigeti-Buck, K., Cai, W., Meyer, C. W., Pfluger, P. T., Fernández, A. M., Luquet, S., Woods, S. C., Torres-Alemán, I., Kahn, C. R., Götz, M., Horvath, T. L. y Tschöp, M. H. (2016). Astrocytic Insulin Signaling Couples Brain Glucose Uptake with Nutrient Availability. *Cell*, 166(4): 867-880. doi: 10.1016/j.cell.2016.07.028.
- Hernández, E. (2014). *Regulación de la captación de glucosa en astrocitos por el eje insulina/IGF-I*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10486/664715>.
- Hernández, E., Fernández, A. M., Pérez-Álvarez, A., Genis, L., Bascuñana, P., Fernández de la Rosa, R., Delgado, M., Ángel Pozo, M., Moreno, E., McCormick, P. J., Santi, A., Trueba-Saiz, A., García-Cáceres, C., Tschöp, M. H., Araque, A., Martín, E. D. y Torres Alemán, I. (2016). The insulin-like growth factor I receptor regulates glucose transport by astrocytes. *Glia*, 64(11): 1962–1971. doi: 10.1002/glia.23035.
- Hodgkin, A. L. y A. F. Huxley. (1952). Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo. *The Journal of Physiology*, 116(4): 449-472. doi: 10.1113/jphysiol.1952.sp004717.
- Jagua, A., Marín, R. A., Granados, L. A. y Ávila, V. (2008). Insulina cerebral. *Colombia Médica*, 39(1): 107-116. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/cm/v39n1/v39n1a14.pdf>.
- Jaramillo-Magaña, J. J. (2013). Metabolismo cerebral. *Anestesiología en Neurocirugía*, 36(1): 183-185. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/rma/cma-2013/cmas131ar.pdf>.
- Korovaichuk, M. A. (2013). *Descomposición de potenciales de campo local en sus fuentes presinápticas y su aplicación al estudio de dinámica de redes neuronales en el hipocampo*. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Disponible en: <https://core.ac.uk/reader/19722461>.
- Laron, Z. (2001). Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone. *Molecular Pathology*, 54(5): 311–316. doi: 10.1136/mp.54.5.311.
- Magistretti, P. J. y Pellerin, L. (1999). Astrocytes Couple Synaptic Activity to Glucose Utilization in the Brain. *News in Physiological Sciences*, 14(5): 177–182. doi: 10.1152/physiologyonline.1999.14.5.177.
- Martín, M. (2018). *Regulación de la actividad neuronal mediada por astrocitos en la porción medial de la amígdala central*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10486/684230>.
- Martínez-Gómez, A. (2014) Comunicación entre células gliales y neuronas I. Astrocitos, células de Schwann que no forman mielina y células de Schwann perisinápticas. *Medicina e Investigación*, 2(2): 75-84. doi: 10.1016/S2214-3106(15)30002-9.

- Mestizo-Gutiérrez, S. L., Hernández-Aguilar, M. E., Rojas-Durán, F., Manzo-Denes, J. y Aranda, G. E. (2014). La Enfermedad de Alzheimer y la Diabetes Mellitus. *Revista eNeurobiología*, 5(10): 1-14. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/272158104>.
- Moreno, R. D., Pedraza, C. y Gallo, M. (2013). Neurogénesis hipocampal adulta y envejecimiento cognitivo. *Escritos de Psicología*, 6(3): 14-24. doi: 10.5231/psy.writ.2013.2510.
- Morimoto, S. (2000). Mecanismos moleculares que intervienen en la regulación de la síntesis de insulina por glucosa. *Revista del Hospital General Manuel Gea González*, 3(3): 118-120. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=10419>.
- Muñoz, M. (2013). *Estudio experimental de la influencia de la administración de IGF-1 y de su análogo peptídico Pep-1, en cultivos celulares de condrocitos humanos*. Trabajo Fin de Máster. Universidad CEU San Pablo. Disponible en: <https://rebiun.baratz.es/rebiun/record/Rebiun15396462>.
- Olivares, J. A. y Arellano A. (2008). Bases moleculares de las acciones de la insulina. *Revista de Educación y Bioquímica*, 27(1): 9-18. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/242629719>.
- Olivares, J. D., Juárez, E. y García, F. (2015). El hipocampo: neurogénesis y aprendizaje. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*, 5(1): 20-28. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/282251666>.
- Palumbo, M. L. (2011). *Influencia del balance TH₁/TH₂ en las alteraciones neuroinmunes y conductuales inducidas por estrés crónico moderado. Reversión con copaxone*. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires. Disponible en: <https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar>.
- Perea, G. y Araque, A. (2003). Nuevas vías de información en el sistema nervioso: Comunicación entre astrocitos y neuronas. *Revista de Neurología*, 36(2): 137-144. doi: 10.33588/rn.3602.2002601.
- Russell, J. W., Golovoy, D., Vincent, A. M., Mahendru, P., Olzmann, J. A., Mentzer, A. y Feldman, E. L. (2002). High glucose-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurons. *The FASEB journal*, 16(13): 1738–1748. doi: 10.1096/fj.01-1027com.
- Salatino, D. R. (2013). *Psiquis. Estructura y función*. Mendoza, Argentina: Autoedición. ISBN: 978-987-33-3808-3. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/256455527>.
- Salatino, D. R. (2018). La geometría funcional como fundamento de la estructura y la función del aparato psíquico. *Psicopatología y Salud Mental del niño y del adolescente*, 32, 77-94. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/329781517>.
- Vicent, A. M., McLean, L. L., Backus, C. y Feldman, E. L. (2005). Short-term hyperglycemia produces oxidative damage and apoptosis in neurons. *The FASEB Journal*, 19(6): 638-640. doi: 10.1096/fj.04-2513fje.
- Xu, X., Bennett, S. A., Ingram, R. L. y Sonntag, W. E. (1995). Decreases in growth hormone receptor signal transduction contribute to the decline in insulin-like growth factor I gene expression with age. *Endocrinology*, 136(10): 4551–4557. doi: 10.1210/endo.136.10.7664676.
- Zedalis, J. & Eggebrecht, J. (2018). *Biology for AP Courses*. Houston, Texas, Estados Unidos: OpenStax. ISBN: 1-947172-41-7. Disponible en: <https://openstax.org/details/books/biology-ap-courses>.
- Zherebitskaya, E., Akude, E., Smith, D. R. y Fernyhough, P. (2009). Development of selective axonopathy in adult sensory neurons isolated from diabetic rats: role of glucose-induced oxidative stress. *Diabetes*, 58(6): 1356–1364. doi: 10.2337/db09-0034.