



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

LIC. QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS CLÍNICOS

Tesis presentada para obtener el grado de:

Licenciatura en Químico Farmacobiólogo

“Análisis bioinformático de las rutas metabólicas de
carbohidratos en tallo y cerebelo en un modelo de
tubulinopatías”

Presenta: Q.F.B. EMMANUEL OTHON HIGUERA

Director de Tesis:

D. C. Bertha Alicia León Chávez

Co-director de Tesis:

M. C. Alejandro González Vázquez

MIEMBROS DEL JURADO DE LA TESIS

Dr. Eduardo Miguel Brambila Colombres

Dr. Samuel Treviño Mora

Dra. Guadalupe Soto Rodríguez

Mayo 2022

0

Agradecimientos.

Me encuentro infinitamente agradecido con Dios, que ha puesto cada peldaño, sabiduría y entendimiento, agradezco por la salud, bienestar, por guardarme de todo peligro en todo momento, por estar en momentos de angustia, frustración y temor, pero también en la felicidad, alegría y salud, ha sido mi fuerza desde el primer momento y lo seguirá siendo.

A mis padres, que con altas y bajas permanecieron, dándome todo tipo de apoyo, asegurándose de no dejarme nunca sin lo necesario para estudiar dignamente, y a pesar de no tenerlos cerca, siempre los he llevado en mi corazón, que se alegra y emociona cada vez que los puede ver, gracias por las fuerzas que cada palabra que dieron a mi ser, agradezco por el carácter que me ayudaron a formar y por la autodependencia, que me ayudo a sobrellevar momentos críticos de la vida, gracias por ser y estar.

A mis hermanos, que en todo momento brindaron palabras de esperanzas, que día a día me enseñaron a creer, a no desfallecer y a levantarme, pues con ustedes aprendí que, a pesar de las adversidades y topes de la vida, se llevan mejor unidos, los aprecio los amo, anhelo verlos crecer, ser mejores cada día, mostrando esa rudeza en no querer conformarse con el presente.

A mis amigos, hermanos de otra madre, sangre de mi sangre, que están, llegaron y que ya se han ido, a aquellos que me enseñaron a creer que existe gente a la que no le importa ayudar sin conocerte, que cada día me hacen sentir acompañado, a cambio de nada, a aquellos que con el tiempo han formado parte de mi vida, que la han marcado, gracias por ser ustedes, no podría estar más a gusto con nadie más, espero verlos es esta vida todavía, a quienes ya no están, verlos en otra.

A mi directora, asesor y grupo de trabajo de tesis, que sin conocerme, presencialmente, me dieron la oportunidad de formar parte de su equipo y hacerme sentir apreciado y motivado, que han estado pendientes desde el inicio y hasta el fin de este peldaño que han aportado nuevas experiencias que no hubiese encontrado en otro lugar, con cariño me han corregido y con ese mismo cariño me han enseñado.

Dedicatoria.

Dedico el trabajo realizado a Dios, que así me lo permitió, en todo momento me permitió la salud y bienestar, se lo dedico a toda mi familia, cercana y lejana, que creyó en mí, este es solo un paso más, pero uno que me llena de orgullo, y sé que mis padres se sienten igual, esto va por ustedes, por mis hermanos, a quienes espero dejarles una lección, nunca desistan de sus sueños, aférrense a sus metas hasta verlas concluidas, nunca se conformen, siempre vayan por más.

Se lo dedico a todos mis amigos, de todos los niveles de estudio, por en su momento ser apoyo inigualable y permitirme aprender juntos, a todos mis profesores, maestros, doctores, ingenieros, licenciados y demás, por compartir conocimientos fundamentales, de todo tipo, que me ayudaron a posicionarme en donde ahora me encuentro.

Se lo dedico a todos que sin conocerme vieron potencial en mí, a aquellos que conociéndome me ayudan a cada día ser mejor, y a aquellos que estuvieron en momentos difíciles, que aún están a pesar de ello, a todos los que ahora ya no están, pero que marcaron mi vida, se lo dedico a aquellos que me alientan y hacen ser mejor, nada lo hubiese logrado solo, esto va por todos.

*Toda nuestra ciencia,
comparada con la realidad,
es primitiva e infantil...
y sin embargo es lo máspreciado
que tenemos.*

*Albert Einstein
(1879-1955).*



*Cuando era pequeño le temía a la oscuridad,
el camino, con un cielo nocturno, me aterraba,
ahora siento un extraño gusto por este,
porque solo en él, puedo contemplar las estrellas.*

"pensamiento".



ÍNDICE

Agradecimientos.	1
Dedicatoria.	2
Abreviaturas:	7
Palabras clave:	10
MARCO TEÓRICO	11
Antecedentes:	11
Ilustración 1	12
Esquema 1.	16
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:	22
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN:	23
JUSTIFICACIÓN:	23
OBJETIVOS	25
Objetivo general:	25
Objetivos particulares:	25
HIPÓTESIS:	25
DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	26
a. Tipo de estudio	26
b. Definición del universo	26
c. Tamaño de la muestra	26
d. Tipo de muestreo	26
e. Criterios de selección	26
i. Criterios de inclusión	26
ii. Criterios de exclusión	26
iii. Criterios de eliminación	27
f. Definición del grupo control	27
g. Variables y definición de variables	27



h. Manejo estadístico de los datos y pruebas estadísticas	27
i. Aspectos bioéticos	27
j. Riesgos de la investigación	27
k. Carta de consentimiento informado	28
METODOLOGÍA:	28
Estrategias	28
Métodos y sus fundamentos	28
Flujo de trabajo.	28
Métodos.....	29
1. Obtención de muestras	29
2. Extracción de ARN	29
3. Cuantificación	29
4. Integridad del ARN	29
Ilustración 2.....	30
5. Microarreglo	30
Ilustración 3.....	31
6. Selección de genes	31
Ilustración 4.....	32
7. Reactome.....	32
8. CmapTools	34
9. Kegg	35
Control de calidad.....	36
Medidas de seguridad	36
RESULTADOS:.....	37
Tabla 1.....	39
Tabla 2.....	40
DISCUSIÓN:.....	41
Ilustración 5.....	50



CONCLUSIÓN.....	51
PERSPECTIVAS.....	52
ORGANIZACIÓN	53
APÉNDICES.....	53
ANEXO I. Definiciones	54
Descripción de los genes evaluados.....	54
Ilustración 6.....	55
Ilustración 7.....	56
Ilustración 8.....	57
Ilustración 9.....	58
Ilustración 10.1. y 10.2	59
Ilustración 11.....	60
BIBLIOGRAFÍA:	63

Abreviaturas:

α -KG: α -cetoglutarato

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AGBM: Agua grado biología molecular.

ATP: Adenosín trifosfato.

Atp5j: Subunidad de tallo periférico F6 (gen).

Ala: Alanina

ARN: Ácido ribonucleico

CGT: Enzima cerebrósido galactosiltransferasa

CNP: 2',3'-nucleótido fosfodiesterasa

CS: Citrato sintasa.

CTE: cadena transportadora de electrones.

Cy3: Cianina 3.

Cy5: Cianina 5.

EA: Esclerosis amiotrófica

Eno: Enolasa.

F4: Generación F4

FAD⁺: Flavín adenín dinucleótido, oxidado.

FADH₂: Flavín adenín dinucleótido, reducido.

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

Km: Concentración de sustrato a la cual la velocidad de la reacción es la mitad de la V_{max}.

G6pc: Glucosa 6-fosfatasa (gen)

G6pd: Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (gen)

GABA: Ácido γ -aminobutírico

Gad: Glutamato descarboxilasa (gen)

Galt: Galactosa 1-fosfato Uridililtransferasa (gen)

Gal: Galactosa

GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

Glc: Glucosa

Glu: Glutamato

GLUT: Transportador de glucosa

TGO/ASAT: Aspartato aminotransferasa

TGP/ALAT: Alanina aminotransferasa

HK: hexoquinasa

LDH: lactato deshidrogenasa

MAG: Glicoproteína asociada a la mielina

MAP: Proteína asociada a los microtúbulos

MAS: Enzima málica

MCT: Transportador de monocarboxilatos

MBP: Proteína básica de mielina

min: minutos

mg: miligramos

Mg²⁺: Magnesio ionizado

NADP⁺: Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato, oxidada.

NAD⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido, oxidada.

NADPH: Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato, reducida.

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido, reducida.

OAA: Oxalacetato.

PFKFB1: 6-fosfofructo-2-cinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa 1

Pfk: Fosfofructoquinasa (gen)

Phkg: Fosforilasa quinasa (gen)

PK: piruvato quinasa

PLP: Proteína proteolipídica

PPP: ruta de las pentosas fosfato (acrónimos en inglés)

Pyr: Piruvato

rno: *Rattus norvegicus*.

ROS: Especies reactivas de oxígeno

r.p.m: revoluciones por minuto.

s: segundos.

SD: *Sprague-Dawley*

Slc2a2: Transportado de solutos miembro 2.

Slc37A4: Transportador translocasa de glucosa-6-fosfato

SNC: Sistema nervioso central

TA: Temperatura ambiente

taiep: Acrónimos en inglés para un modelo de tubulinopatías (tremor, ataxia, immobility, epilepsy y paralysis).

TCA: ciclo de los ácidos tricarboxílicos

Thr: Treonina



Tubb 4: Tubulina beta 4

Vmax: Valor máximo al que tiende la curva experimental

°C: Grados Celsius

μL: Microlitros

Palabras clave:

taiep, *SD*, microarreglos, tubulinopatías, hipomielinización, desmielinización, Reactome, Kegg, carbohidratos, tallo, cerebelo, metabolismo, astrocito, neurona, oligodendrocito, mapas metabólicos, bioinformática.

MARCO TEÓRICO

Antecedentes:

La rata *taiep* es un modelo animal que representa las enfermedades hipomielinizantes-desmielinizantes, surge por endogamia selectiva, a través de la cruce cosanguínea entre ratas *Sprague-Dawley* (SD). Esta rata fue obtenida y descrita por Holmgren y cols., en 1989 en el Instituto de Ciencias Fisiológicas del Instituto de Ciencias de la Universidad Autónoma de Puebla, Pue. en México (Holmgren et al., 1989). Las ratas presentan signos muy particulares y rasgos fenotípicos similares entre los individuos a partir de la generación 4 (F4).

Las ratas *taiep* recibe su nombre por el acrónimo de los signos que padecen, engloba las alteraciones motoras que aparecen cronológicamente, iniciando con temblores (1^o mes), seguidos por ataxia (4^o mes), los episodios de inmovilidad (5^o - 6^o mes), la epilepsia (3^o - 8^o mes) y parálisis progresiva (7^o mes) (***taiep***) (Holmgren et al., 1989; Duncan et al., 1992).

El modelo *taiep* se origina a partir de una mutación autosómica recesiva, en el gen de tubulina beta 4 (Tubb4, Ala302Thr) (Duncan et. al., 2017) que afecta el citoesqueleto de los oligodendrocitos (Duncan et al., 1992; Lunn et. al.1995; Couve et al.1997). Este defecto microtubular temprano se presenta en los 12-15 días posnatales (Couve et. al., 1997) caracterizado por la acumulación progresiva de microtúbulos (Moller et. al., 1997) que conducen a la alteración en el transporte vesicular de las proteínas (Duncan et al., 1992; Lunn et al., 1997).

La rata *taiep* es reconocida como un modelo animal que presenta hipomielinización-desmielinización progresiva (Duncan et. al., 1992), lo cual interrumpe la formación y mantenimiento de la mielina en el sistema nervioso central (SNC) (Duncan et. al., 1992, Couve et. at., 1997, Möller et. al., 1997).

Los principales componentes afectados de la vaina de mielina son la proteína proteolipídica (PLP), una de las más abundantes de la vaina de mielina; la proteína básica de la mielina (MBP) que es sintetizada en ribosomas libres; y la glicoproteína

asociada a la mielina (MAG) (O'Connor et al., 1999, Trapp, 1990; Brophy et al., 1993; Kalwy y Smith, 1994) y la proteína asociada a los microtúbulos (MAP), todas ellas son componentes estructurales que permiten la estabilización del citoesqueleto en los oligodendrocitos (Duncan et al., 1992; Lunn et al., 1995; Fischer et al., 1990; Vouyiouklis y Brophy, 1993).

Las vainas de mielina son estructuras multilaminares compuestas por más de 40 lípidos por lo tanto su composición total es del 70% a 85% e hidrofóbica (Poitelon et al., 2020). Los tres lípidos principales comprenden un 65%, de los cuales el 20% corresponde a galactosilceramidas (GalC) y sulfato de cerebrósidos (CBS) un derivado sulfatado (Dicko et al., 2003), por su parte el colesterol comprende un 40% y los fosfolípidos el 40%, este enriquecimiento elevado de lípidos en las vainas de mielina juega un papel importante en el recubrimiento axonal para mantener la comunicación neuronal por señales eléctricas (Schmitt et al., 2015).

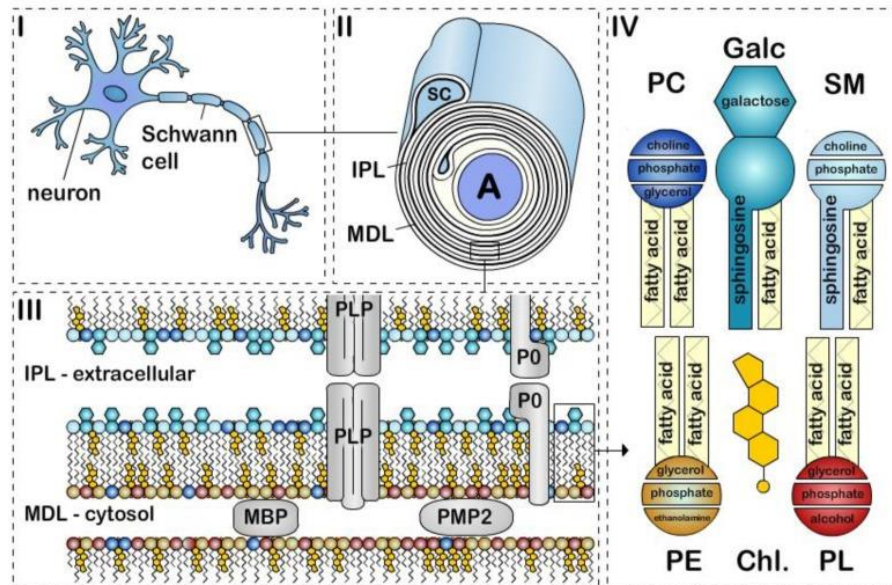


Ilustración 1.

Representación esquemática estructural de la vaina de mielina comprendida por: (I) axón mielinizado, (II) vaina de mielina concéntrica alrededor del axón, (III) membrana, bicapa lipídica que muestra la proteína proteolípida (PLP) como proteína integral de varios pasos y la proteína básica de mielina (PBM) de tipo periférica en el sistema nervioso central y P0 y PMP2 en el sistema nervioso periférico y (IV) tipos principales de lípidos. Colesterol (Chl.), Galactosilceramida (Galc, cian), Plasmalógeno (PE,



amarillo), Fosfatidilcolina (PC, azul oscuro), Esfingomielina (SM, azul claro) y otros fosfolípidos (PL, rojo) (tomado de Schmitt et. al., 2015).

La reducción progresiva en el calibre de los axones mielinizados está fuertemente asociada a la acumulación de microtúbulos y la cronología de la rata (Couve 1997, Möller et. al., 1997). Duncan et al., reportan que la disminución en la concentración de las proteínas de la vaina de mielina (Duncan et. al, 1992) está acompañado de una alteración en el transporte vesicular (Duncan et al., 1992; Lunn et. al., 1997).

La anomalía en el transporte vesicular agrava la disfunción en el transporte de los componentes de la mielina (Wilson y Brophy, 1989; Carson et al., 1997) y conduce al incremento del daño en el SNC (Möller et al., 1997, O'connor et al., 1999). Möller y cols., demostraron que existe una correlación entre la reducción en los niveles de la PLP y la MBP respecto a los niveles de CNP y MAG, (Möller et. al., 1997), lo que sugiere que la PLP y la MAG podrían estar asociadas con la acumulación de los microtúbulos (O'Connor et. al., 1999) permitiendo concluir que existe un transporte de proteínas deficiente en la rata *taiep* (O'connor et. al., 1997, Chavez et. al., 2001).

El incremento del estrés nitrosativo y la astrocitosis reactiva progresiva (Jouanne et. al., 2017) están relacionados con la desestabilización de los microtúbulos y contribuye al aumento de la neurotoxicidad, neuroinflamación y deterioro del SNC en la rata *taiep* (León-Chávez et. al., 2001, León-Chávez et. al., 2003). Además, la neuroinflamación (Duncan et al., 1992; Lunn et al., 1995; Fischer et al., 1990; Vouyiouklis y Brophy, 1993) incrementa la actividad de la 2',3'-nucleótido fosfodiesterasa (CNP), enzima relacionada con la degeneración de la materia gris y deterioro de los oligodendrocitos (Platt et. al., 2021).

Los oligodendrocitos son las células encargadas de la mielinización (Tepavcevi'c V. 2021), un proceso que requiere una demanda metabólica considerable (DiNuzzo. et. al., 2019). Sin embargo, la acumulación de microtúbulos y la astrocitosis reactiva son factores determinantes que conducen a la disrupción de la mielinización presente en el modelo *taiep* (Duncan et. al., 1992). Esto nos permite sugerir el desarrollo de una alteración en el metabolismo del SNC que podría potenciar la



patología de la rata *taiep* (Duncan et. al., 1992, Möller et. al., 1997, Couve et. al. 1997, Chavez et. al., 2011), que a nivel celular podría estar afectando a oligodendrocitos, astrocitos y neuronas (Tepavcevi'c V. 2021). La rata *taiep* presenta una hipomielinización progresiva en dirección caudo-rostral, siendo la médula espinal, tallo cerebral y cerebelo las más afectadas al mes de edad (Moller et al., 1997).

El cerebelo está dividido en tres secciones (superior, medio e inferior), formado por folículos contiguos, cuenta con una alta población neuronal y guarda conexión e interacción con el proencéfalo y el tronco encefálico, este último se encuentra sobre el tallo o tronco cerebral (Delgado-García, 2001). El cerebelo está encargado del control en la regulación sobre funciones perceptivas, cognitivas y motoras generados en el SNC (Ghez et. al., 2000). El cerebelo es estimulado por la activación de receptores sensoriales localizados en la corteza cerebral, que a su vez proyectan prolongaciones hacia los centros motores del tronco del encéfalo y la corteza cerebral (Delgado-García, 2001).

El cerebelo está conformado por astrocitos y neuronas como las células de Purkinje, estrelladas, en cesta (localizadas en las capas superficial e intermedia) y las células de Golgi (con dendritas en la capa superficial y somas en el interior) de naturaleza inhibitoria (GABAérgicas) (Altman, 1982; Altman & Das, 1966; Takayasu et al., 2006, 2009), salvo las células granulares (parte interna del cerebelo) que son excitatorias (glutamatérgicas) (Delgado-García, 2001), también se cuentan con fibras paralelas dispuestas en la superficie, descritas como axones delgados provenientes de las células granulares. La parte intermedia está constituida por somas de las células de Purkinje ordenada, sus axones representan la única vía de salida hacia la corteza cerebelar. La parte interior del cerebelo está formada por las células granulares que llegan a representar hasta la mitad de las neuronas en el SNC, en esta sección también se encuentran las células Lugaru y las células en cepillo, poco conocidas en aspectos electrofisiológicos (Delgado-García, 2001).

Las células de Purkinje tienen tasas metabólicas relativamente elevadas debido a la restauración del potencial de membrana de un alto número de dendritas después de la activación tónica para inhibir los núcleos motores en el cerebelo (Howarth et al.,

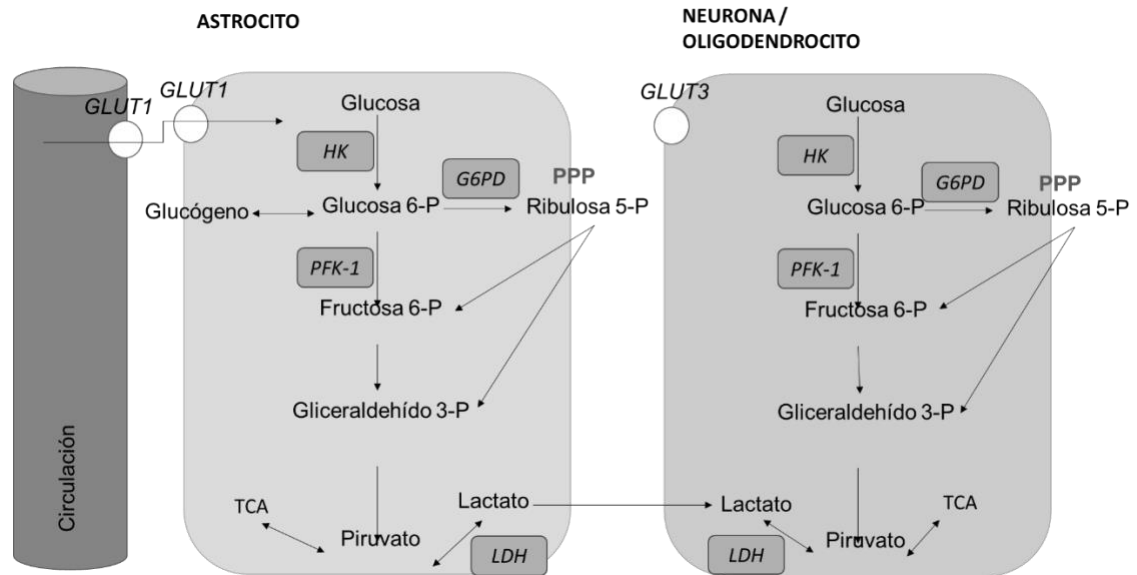


2010, 2012; Connolly et al., 2007; Welsh et al., 2002). El metabolismo oxidativo en cerebelo es mayor que en regiones del cerebro (Ferreira et. al., 2021, Melo et. al., 2007), se conoce que el metabolismo de la corteza cerebelar es menor en comparación al mostrado en la corteza cerebral (Son et. al., 2012).

El tallo cerebral es la extensión inferior del cerebro que conecta a la médula espinal y el cerebelo, está compuesto por cuatro regiones, el diencéfalo, el mesencéfalo, la protuberancia y el bulbo raquídeo (Fernández-Gil et. al., 2010). El tallo alberga a la mayoría de los centros neurales responsables de la secreción de los principales neurotransmisores monoaminérgicos, como a la serotonina (en los núcleos de rafe), dopamina y noradrenalina (Carandini et. al., 2021; Son et. al., 2012).

Por su parte, el metabolismo del tallo cerebral (tronco encefálico) ha sido poco estudiado. Se ha reportado que el metabolismo de glucosa es menor en tallo cerebral, específicamente en los núcleos de rafe, en comparación con la corteza cerebral, aunque existe una similitud entre el metabolismo de la corteza cerebelar y el tallo cerebral (Son et. al., 2012).

Durante el desarrollo del tejido neural, el astrocito juega un papel clave para el consumo de glucosa. El astrocito dirige el aporte metabólico al biotransformar eficientemente la glucosa y ceder sustratos tipo monocarboxilatos (lactato, piruvato, acetoacetato y β -hidroxibutirato) a la neurona y al oligodendrocito (Tepavcević V. 2021). Por su parte, la neurona y el oligodendrocito muestra eficiencia metabólica, al aceptar fácilmente a los monocarboxilatos e incorporándolos a las respectivas rutas metabólicas para mantener el aporte bioenergético (DiNuzzo et. al., A. 2019). Mientras que, el oligodendrocito dirige a los monocarboxilatos como el acetoacetato o el β -hidroxibutirato hacia la síntesis de ácidos grasos con la finalidad de mantener la naturaleza lipídica de la vaina de mielina (DiNuzzo et. al., A. 2019).



Esquema 1.

Metabolismo de la glucosa entre astrocito, neurona y oligodendrocitos (modificado de Brekke et. al., 2015).

El metabolismo general de carbohidratos en el SCN y en tallo-cerebelo se encuentra estructurado de la siguiente manera:

La entrada de glucosa depende del funcionamiento de mecanismos específicos encargados de la incorporación de carbohidratos al interior de la célula a través de transportadores de glucosa (Glc), en el caso del SNC, existen dos variantes, los cotransportadores dependientes de Na^+ (SGLT) y tres transportadores facilitados (GLUT1, GLUT2 y GLUT3) en tallo-cerebelo (Yu et. al., 2013).

El GLUT1 en los astrocitos posee una alta actividad y afinidad, dado su ubicación permite el consumo alto de glucosa (Vannucci 1994). El transportador GLUT3 muestra una mayor expresión en neuronas. Mientras que el GLUT2 dada su baja afinidad por la glucosa es considerado un sensor de glucosa (Thorens, 2015). Además, el astrocito cuenta con transportadores de monocarboxilatos (MCT) para el consumo dependiente de moléculas como el lactato y piruvato. El GLUT1 tiene una tasa de expresión mayor durante etapas tempranas de maduración neuronal, debido



a la alta demanda energética (Tepavcević V. 2021). Los cotransportadores dependientes de Na^+ - SGLT, muestra mayor expresión en neuronas glutamatérgicas del hipocampo y en células de Purkinje del cerebelo, aunque el peso de recaptura de Glc a través de la barrera hematoencefálica continúa dándose a través de los transportadores GLUT (Yu et. al., 2013).

En el citosol de la célula, la Glc es modificada bioquímicamente a través de la actividad de la familia de hexoquinas, encargadas de fosforilar a diferentes monosacáridos (manosa y fructosa) pero con preferencia por la Glc. La glucólisis inicia con la formación de glucosa-6-P (G6P), y que además corresponde al primer sitio de control en la glucólisis (Dienel 2019, Brekke et. al., 2015). El segundo sitio de control es la bifosforilación de la fructosa-6-P (F6P) en fructosa-1,6-bifosfato (F1,6biP), esta reacción es catalizada por la fosfofructoquinasa 1, una enzima alostérica. La 6-fosfofructo-2-cinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa 1 (PFKFB) posee actividad bimodal pues está encargada tanto del aporte de fructosa-6P debido a que con actividad quinasa, mientras que su actividad fosfatasa dirige degradación de la fructosa-2,6-P. La PFKFB regula la glucólisis en periodos de demanda energética al participar activamente en la isomerización reversible de la glucosa a fructosa, este último metabolito muestra un consumo preferencial en cerebelo y tallo. Cerca del final de la glucólisis se lleva a cabo la pérdida de una molécula de agua para continuar con el tercer y último sitio de control en la glucólisis que está mediado por la enzima piruvato cinasa (PK), una enzima alostérica que cataliza la formación de piruvato, que puede ser biotransformado a lactato o alanina e incorporarse al ciclo de Krebs a través de la piruvato deshidrogenasa (PDH) o la piruvato carboxilasa (PC) en el caso del astrocito (Dienel, 2019).

El metabolismo de carbohidratos mantiene fuerte relación con sitios metabólicos (Tepavcević V. 2021). Por ejemplo, la participación de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) colabora en el reciclaje de NAD^+ ya sea a través de la enzima málica (MAS) o de la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) y que al mismo tiempo puede participar en la regulación del estado redox entre la mitocondria y el citosol. Mientras que, en la ruta de las pentosas, el aporte de carbohidratos podría



mantener el funcionamiento de un segundo sensor del estado redox celular a través del reciclaje de $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ (Brekke et. al., 2015; DiNuzzo. et. al., 2019).

En la ruta de las pentosas se mantiene la homeostasis del carbono, proporcionando precursores de nucleótidos y aminoácidos, dando resultado a moléculas reductoras importantes en el anabolismo frente al estrés oxidativo. Esta ruta se divide en una fase oxidativa, dando como resultado dióxido de carbono (CO_2), ribulosa-5-fosfato y NADPH ; y una no oxidativa, donde se tienen como productos a intermediarios glucolíticos (fructosa-6-fosfato y gliceraldehido-3-fosfato), azúcares pseudoheptulosa, ribulosa-5-fosfato requerido para sintetizar ácidos nucleicos y precursores de fosfatos para síntesis de aminoácidos (Stincone et. al., 2015).

El aporte energético es dado por diferentes monosacáridos; la galactosa es considerado un discreto suministro de G6P a través de la ruta de Leloir (galactolisis), ruta que guarda relación con la síntesis de cerebrósidos. La alteración de la galactólisis repercute directamente sobre la producción de glucosa-1-P y el mantenimiento de UDP-galactosa (hexosas), requerido para el funcionamiento de enzima cerebrósido galactosiltransferasa (CGT), que participa en la síntesis de galactolípidos y galactoproteínas (Lebea & Pretorius, 2005).

La G6P puede ser incorporada a la ruta de las pentosas fosfato, es utilizada para la formación de monosacáridos de diferentes esqueletos de carbono (3, 4, 5, 6 y 7), donde las pentosas son pilares intermediarios en la formación de desoxirribosa utilizada para la formación de desoxirribonucleótidos. La glucosa-6-P deshidrogenasa (G6PDH) es una enzima clave de la ruta de las pentosas, encargada del reciclaje de dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato (NADPH), un cofactor enzimático que participa en la preservación celular, actividad antioxidante (Dieniel, 2019) dirigida a la eliminación de especies reactivas (DiNuzzo, 2019, Psarra et. al., 1998).

El retículo endoplasmático representa un reservorio importante de G6P, es transportada por un grupo de proteínas conocido como transportador translocasa de glucosa-6-P (SLC37A4) (Marquardt et. al. 2020). La G6P es desfosforilada por fosfatasas localizadas en el lumen endoplasmático como un mecanismo de desactivación de la Glc. Las fosfatasas son expresadas en las células de Purkinje, en



neuronas del tronco cerebral y las células piramidales de la corteza cerebral, esto podría deberse a su alto contenido de retículo endoplásmico rugoso y liso (Stephens et. al., 1976). Estas enzimas regulan la homeostasis de la glucosa y guarda relación con la gluconeogénesis y la glucogenólisis glial, que pueden almacenar glucógeno que no es equiparable al resguardo en órganos como el hígado o el músculo (Dienel 2019).

El piruvato (Pyr) derivado de la glucólisis debe sufrir una serie de transformaciones antes de ser incorporado al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT) en la mitocondria, para ello el piruvato debe translocarse hacia el interior de la mitocondria en donde se encuentra con la PDH, complejo multienzimático, que en una serie de tres reacciones da como producto al acetil-CoA, existen dos reacciones más, que devuelven al complejo multienzimático al estado de mayor estabilidad (Dienel 2019).

El acetil-CoA en presencia de oxalacetato (OAA) inducen la activación de la citrato sintasa (CS) para producir citrato. Esta enzima es el primer punto de regulación en el CAT. El segundo sitio de regulación es la isocitrato deshidrogenasa (IDH), una enzima alostérica que cataliza la formación de α -cetoglutarato (α -KG) y dinucleótido de nicotinamida-adenina reducido (NADH). El tercer sitio de regulación es el complejo de la α -cetoglutarato deshidrogenasa (KDH) que permite la formación de succinil-CoA y NADH a partir de α -KG. La única reacción de fosforilación a nivel de sustrato del ciclo es producida por la succinil-CoA sintetasa que utiliza como sustrato al succinil-CoA y produce succinato y guanosina trifosfato (GTP), un importante transportador de electrones generado es el dinucleótido de flavina-adenina ($FADH_2$) donde a partir de succinato y FAD^+ produce fumarato y $FADH_2$ facilitado por la enzima succinato deshidrogenasa (Dienel, 2019, Brekke et. al., 2015).

El CAT funge como ruta central, por ello no solo recibe aporte por parte del metabolismo derivado de carbohidratos, también existe el aporte derivado del metabolismo de lípidos, donde los ácidos grasos y el glicerol aporta acetil-CoA, y del metabolismo de proteínas que por derivados de aminoácidos se aporta acetil-CoA u OAA al ciclo, de los cuerpos cetónicos se puede tener aporte de derivados que se integran sin problemas al CAT (Gostomska-Pampuch et. al., 2021).



El CAT adquiere en gran parte al aporte considerable derivado de la glucólisis, sin embargo, la presencia de otros sustratos puede ayudar a mantener activo el ciclo en condiciones de hipoglicemia, teniendo aporte de parte del metabolismo de aminoácidos. Las transaminasas son enzimas encargadas de la transferencia de grupos amino (NH_3^+) entre un aminoácido y un cetoácido para producir un segundo cetoácido y un aminoácido. La alanina aminotransferasa (TGP/ALAT) y aspartato aminotransferasa (TGO/ASAT) tienen un papel importante en la neuromodulación de etapas tempranas del neurodesarrollo al aportar sustratos como el Pyr, Ala, OAA y el α -KG que pueden integrarse al CAT, como mecanismo de compensación al metabolismo e incluso en la síntesis de neurotransmisores (Glu y GABA) (Brekke et. al., 2015). La TGP se encarga de la interconversión reversible de $\text{Pyr} + \text{Glu} \rightarrow \alpha\text{-KG} + \text{Ala}$ y la TGO de $\text{OAA} + \text{Glu} \rightarrow \alpha\text{-KG} + \text{Asp}$ (Yang et. al., 2015).

El Glu es un sustrato común en el funcionamiento de ambas transaminasas y en el cerebro ejerce su actividad como neurotransmisor. El Glu determina en gran medida la maduración neuronal al final de la neurogénesis, a través de la comunicación neuronal dependiendo del establecimiento de sinapsis glutamatérgicas funcionales. La sobreestimulación glutamatérgica en procesos patológicos desencadena daño neuronal, donde las interneuronas se encargan de regular a estas sinapsis a través de la liberación de GABA, donde la glutamato descarboxilasa 2 (GAD2) es la enzima encargada de la biotransformación del Glu a GABA, que muestra regulación neuronal en etapas de sobreproducción de glutamato (Dade et. al., 2020).

Por otra parte, el NADH y FADH_2 producidos en la glucólisis, b-oxidación y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos seden sus electrones, iniciando la respiración oxidativa en la CTE, donde el último aceptor de electrones es el oxígeno y se producen 32 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa metabolizada, gracias a la ATP sintasa, enzima ensamblada por múltiples subunidades, donde se tienen sitios estáticos, rotatorios y de función catalítica (Dieniel, 2019).

Diferentes trabajos sugieren que en procesos neuroinflamatorios existe una disfunción metabólica que podría estar contribuyendo al inicio y progresión de



procesos patológicos como el desarrollo de convulsiones (Alvestad et al., 2011; Tan et al., 2015), similar a lo ocurrido en el modelo *taiep*.

Actualmente, existen pocos trabajos dirigidos al estudio de la regulación génica del metabolismo de carbohidratos y su relación con patologías en el SNC en modelos animales como la rata *taiep*. Estudios bioquímicos no publicados realizados previamente por el Doctor Treviño-Mora y cols, muestran las alteraciones encontradas sobre los niveles de glucosa, HDL, creatinina, urea, bilirrubina total, lipasa, TGO, TGP y en la enolasa neuronal.

Tomando en cuenta lo antes mencionados hasta el momento, podemos considerar que dado los defectos microtubulares y el transporte anómalo de proteínas (Couve et. al., 1997, Moller et. al., 1997, O'connor et. al., 1999), el metabolismo en el SNC de la rata *taiep* se encuentra alterado al mes de edad.

El uso de herramientas bioinformáticas ha facilitado el manejo y análisis de conjunto de datos obtenidos a partir de microarreglos a través de los análisis de mapas (pathway analysis) (Curtis et. al., 2005). Una de estas plataformas bioinformáticas es Reactome. Integra información y recre las redes de vías moleculares resumiéndolas en mapas con el objetivo de obtener resultados puntuales durante la búsqueda de genes de interés. Reactome cuenta con un nivel de organización jerárquico que permite visualizar por estratos a las vías de transducción de señales (Fabregat et. al., 2015).

Kegg es otra herramienta bioinformática, que al igual que Reactome, construye las entradas en mapas bioquímicos, además de mostrar la relación que existiría con enfermedades (Kanehisa et. al., 2007), esto es útil al momento de correlacionar los resultados de una forma sencilla.

Los genes ingresados a las plataformas bioinformáticas parten de metodologías que arrojan información en masa obtenida a partir de microarreglos o chips de ADN. Estos pueden ser fabricados con una base de vidrio, silicio o polímeros de plástico. La importancia de esta metodología en la investigación radica en presentar a los genes alterados en un organismo (Heller M. 2002). Los resultados son mostrados gracias a



la decodificación por software que utilizan herramientas estadísticas como Z-score, dando resultados, en los que se llevó a cabo una normalización de los datos para reducir la variabilidad experimental y conservar la variabilidad biológica (Hedge et. al., 2000).

Además, los valores de Z-score obtenidos muestran relativa practicidad, donde un Z-score de cero indica que no existen cambios en la regulación génica, mientras que valores positivos indican un aumento de regulación y valores negativos representan regulación baja. A partir de esto y considerando que la Z-score tiene una distribución hipergeométrica, lo que indica que aquella Z-score mayor o igual a 2 nos dará una probabilidad del 95% de tener datos con significancia estadística ($P < 0.005$) (Curtis et, al., 2005).

Por último, Cmaptools es una herramienta computacional para la elaboración de mapas conceptuales de fácil manipulación que tienen como objetivo expresar los conocimientos de una manera práctica y sencilla (Cañas et. al., 2004). Esta herramienta fue utilizada para la elaboración del mapa bioquímico propuesto más adelante (mapa 1).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

La rata *taiep* presenta una variedad muy particular de signos propios de enfermedades neurodegenerativas a lo largo de su vida, por ello se ha utilizado como modelo animal que podría semejar las discapacidades motrices que presentan los pacientes que cursan por alguna enfermedad hipo-desmielinizante. Hasta el momento no se cuenta con información concreta acerca del papel del metabolismo de carbohidratos en cerebelo-tallo de la rata *taiep*. Este trabajo se encuentra apoyado de herramientas bioinformáticas que nos permitirán visualizar a lo los genes alterados, así como su comparación con lo reportado en la literatura para dilucidar los defectos que dichos genes podrían aportar de ser codificados como proteínas funcionales.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN:

¿Qué ruta metabólica de carbohidratos se encuentra alterada en cerebelo y tallo en la rata *taiep* al mes de edad?

JUSTIFICACIÓN:

La rata *taiep* posee una mutación en el gen de la tubulina $\beta 4$ (*Tubb4a*), la cual ha sido propuesta como un factor etiológico para desarrollar la hipomielinización-desmielinización generando un cuadro de signos similar a la esclerosis múltiple. En el SNC, los astrocitos participan en el metabolismo energético, proporcionando sustratos claves para que la neurona lleve a cabo sus funciones. Sin embargo, ante un proceso inflamatorio, la funcionalidad del astrocito se encuentra alterada conduciendo al incremento de la astrogliosis reactiva, aumento del estrés oxidativo y la neuroinflamación crónica. Se ha propuesto que, frente a condiciones nocivas, las células del SNC podrían reprogramar su fisiológica activando mecanismos compensatorios con la finalidad de preservar la homeostasis celular.

En este estudio decidimos trabajar con cerebelo y tallo de la rata *taiep*, ambas regiones se encuentran afectadas al mes de edad, debido a que no muestran rasgos evidentes de neurodegeneración, lo que ayudaría a proporcionar información de las afectaciones tempranas en ratas *taiep*.

Actualmente, no existen estudios sobre el metabolismo de los carbohidratos en la rata *taiep*. En este trabajo utilizamos un perfil de regulación de 5000 genes a través de un microarreglo, lo que nos permitió obtener información de las rutas metabólicas afectadas para ayudar a corregir o prevenir procesos neurodegenerativos.

Los microarreglos son un método de biología molecular de alto rendimiento utilizada en el mapeo génico, así como en estudios que brindan información acerca de la regulación génica. El principio de los experimentos de microarreglos es el uso de ARNm o ARN total de células o tejidos. Los miles de secuencias de ARN se hibridan



en paralelo con una gran cantidad de secuencias de ADN inmovilizadas en una superficie sólida en una disposición ordenada y posteriormente marcarlos a través del uso de etiquetas fluorescentes (Schena et al. 1995).

Para tener información precisa los datos obtenidos de los microarreglos, esta debe ser decodificada con la ayuda de una base de datos, para este estudio se optó por el uso de Reactome, para obtener mapas bioquímicos que brindarán información acerca de las alteraciones en el neurometabolismo.

Este trabajo es una investigación bioinformática de tipo retrospectiva que busca contribuir en el esclarecimiento del metabolismo *taiep* hasta ahora poco estudiado.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Analizar bioinformáticamente el metabolismo de carbohidratos en el perfil de regulación de genes de cerebelo y tallo en la rata *taiep* al mes de edad.

Objetivos particulares:

1. Identificar los genes alterados en las rutas metabólicas de carbohidratos a partir de un microarreglo.
2. Proponer un mapa bioinformático de las rutas metabólicas de carbohidratos, para encontrar los genes blancos afectados en la patología *taiep*.

HIPÓTESIS:

El perfil de regulación de genes y la vía metabólica de carbohidratos de carbohidratos del modelo de tubulinopatías se encuentran alterados al mes de edad en tallo y cerebelo.

DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

a. Tipo de estudio

Retrospectivo

b. Definición del universo

Genes regulados positiva o negativamente obtenidos con la metodología del microarreglo.

c. Tamaño de la muestra

Grupos experimentales de un pool con $n = 5$, de cerebelo y tallo.

d. Tipo de muestreo

Aleatorio

e. Criterios de selección

i. Criterios de inclusión

- Se incluyeron a todas las ratas macho con patología *taiep* y controles sanos *Sprague-Dawley (SD)* de un mes de edad.
- Los genes considerados fueron aquellos que mostraron ambos fluoróforos, Cy3 y Cy5.
- Aquellos genes con una Z-score fuera del rango $\geq +2$ y ≤ -2 , con el valor de significancia estadística de $P < 0.05$. Esto es porque se busca identificar cambios en la regulación del análisis estadístico, donde los valores estrictos deben tenerse en consideración (Curtis et. al., 2005).

ii. Criterios de exclusión

- Ratras hembra *taiep* o *SD*, menores o mayores a un mes de edad. Las ratas hembra han mostrado tener neuroprotección hormonal.
- Genes que solo dieron un solo marcaje, ya sea por Cy3 o Cy5.

- Aquellos genes con un rango de Z-score >-2 y $<+2$.

iii. Criterios de eliminación

- Ratas hembra, debido a que, aunque muestran la misma mutación que el macho, fenotípicamente ha mostrado a ser diferentes debido a un factor hormonal.
- Ratas enfermas o con patologías distintas al modelo *taiep*
- Ratas que superan o no cumplen con la edad aceptada.

f. Definición del grupo control

Ratas macho *Sprague-Dawley (SD)* de un mes de edad.

g. Variables y definición de variables

Se trabajará con variables cualitativas, genes con regulación positiva y negativa involucrados en el metabolismo de carbohidratos de células neurales.

h. Manejo estadístico de los datos y pruebas estadísticas

Resultados del microarreglo dados en valores de Z-score proporcionados por el Instituto de fisiología de la UNAM. Con un intervalo de confianza de 95% al considerar valores $\geq 2 \leq$.

i. Aspectos bioéticos

La Norma Oficial Mexicana-NOM-062-ZOO-1999, indica las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Esta Norma es aplicable a los bioterios y/o establecimientos que manejen: roedores (rata, ratón, cobayo, hámster y jerbo), lagomorfos (conejo), carnívoros (perro y gato), primates no humanos y porcinos (NOM-062-ZOO-1999, 2001).

j. Riesgos de la investigación

No aplica.

k. Carta de consentimiento informado

No aplica.

METODOLOGÍA:

➤ Estrategias

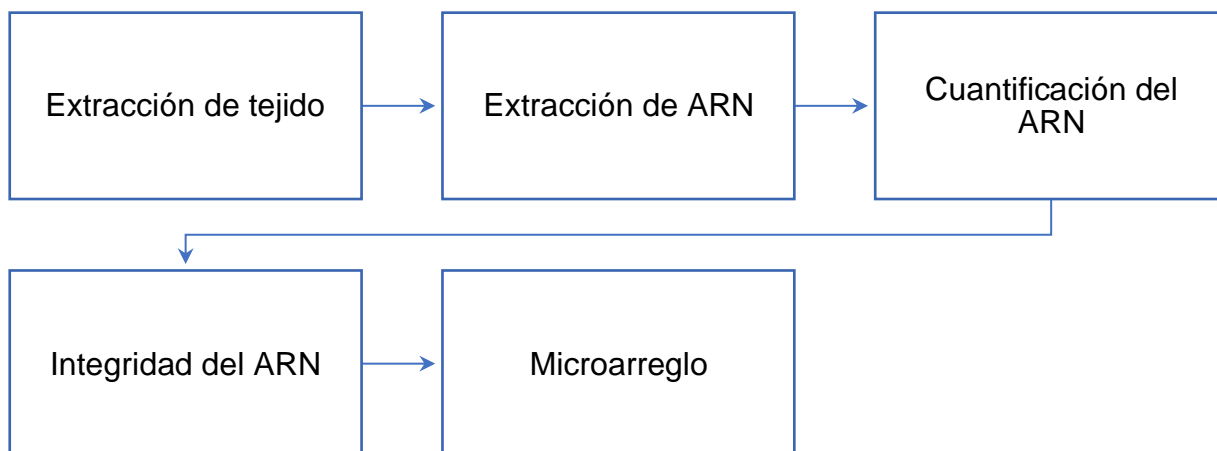
Microarreglo.

➤ Métodos y sus fundamentos

La construcción de microarreglos de ADN es un procedimiento multifacético que implica la obtención de secuencias de ADN o ARN, diseño de oligonucleótidos o cebadores para generar una sonda para cada gen del ADN, seguida por la selección y preparación de una superficie de vidrio adecuada y para depositar la sonda de ADN en su superficie.

Modelo *taiep*. Los animales destetados se mantuvieron en condiciones estándar, alojados en jaulas de acrílico, en una habitación con ciclos de 12 - 12 horas (luz-oscuridad). Destetadas a los treinta días postnatal, alimentados *ad libitum* con dieta 5008 (materno), hipercalórico para engorda, que tiene 4% de fibra, 23% de proteína bruta, 6.5% de grasa bruta y agua *ad libitum*.

Flujo de trabajo.



➤ **Métodos**

1. Obtención de muestras

Se usaron ratas SD y *taiep* de 1 mes de edad (pool, $n = 5$) de las que se extrajo el cerebelo y tallo, fueron almacenados inmediatamente en un tubo de recolección estéril libre de ribonucleasas a -72°C hasta su posterior uso.

2. Extracción de ARN

Por cada 100 mg de tejido por cada muestra, se adicionó 1000 μL de TRizol y se incubó 5 min a temperatura ambiente (TA), después se agregó 200 μL de cloroformo y se agitó vigorosamente por 15 s, se dejó incubar los tubos por 5 min a temperatura ambiente (TA). Pasado este tiempo, los tubos fueron centrifugados a 12500 rpm por 15 min a 4°C y la fase acuosa fue separada. Seguido a esto, se agregó 500 μL de isopropanol y se mezcló por inversión, los tubos fueron incubadas por 10 min a TA. Después los tubos fueron centrifugados a 12000 rpm por 10 min a 4°C y el sobrenadante fue desechado. Posteriormente, se agregaron 1000 μL de etanol (75%) para lavar la pastilla en un golpe con vortex. Por último, los tubos fueron centrifugados a 7500 rpm por 5 min a 4°C , decantando y dejando secar, para re-suspender las pastillas de ARN con agua grado biología molecular (AGBM) y colocar inmediatamente en hielo hasta su uso.

3. Cuantificación

La pureza del ARN fue verificada por espectrofotometría a través de la relación 260/280 nm.

4. Integridad del ARN

La integridad del ARN fue corroborada por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

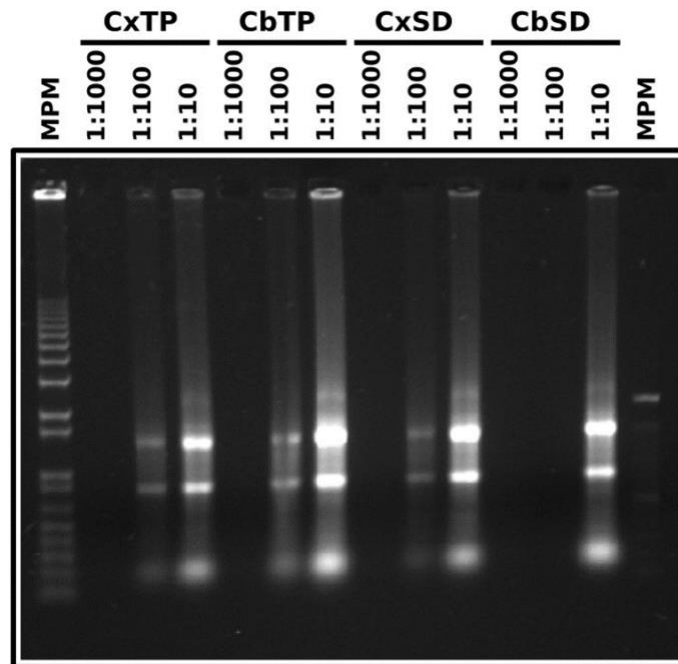


Ilustración 2

Electroforesis en gel de agarosa de la integridad de ARN.

5. Microarreglo

El microarreglo fue realizado en el departamento de microarreglos de ADN del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) (<http://microarrays.ifc.unam.mx/>) a cargo del Dr. Jorge Ramírez Salcedo. Se utilizaron dos muestras con 30 µg de ARN extraído de cerebelo y tallo, una obtenida de 5 ratas problema (*taiep*) y otra de 5 ratas control (SD), cada muestra fue marcada con un fluoróforo diferente, Cy3 y Cy5, que después fue hibridado en el microarreglo.

Esta sección experimental se realizó por duplicado y en ciego, es decir, que las muestras se diferenciaron como uno y dos sin saber si se trataba del control o del problema. Además, fueron marcadas intercaladamente con el fluoróforo y se hibridaron en el microarreglo. Los microarreglos utilizados fueron el Rn5K_05_26 y el Rn5K_05_27.

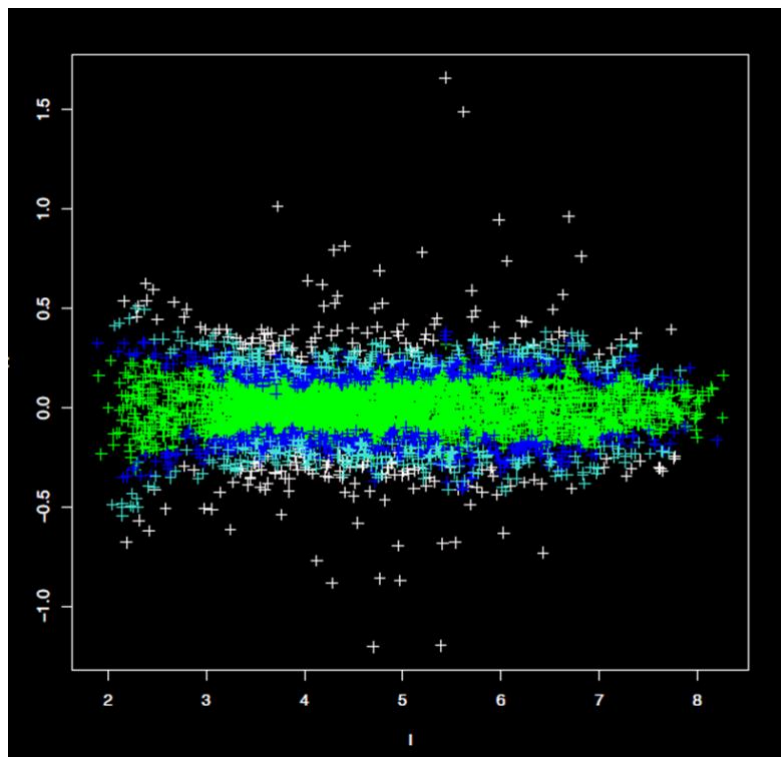


Ilustración 3.

Gráfico de todos los resultados dados por el análisis con el microarreglo.

6. Selección de genes

Dentro de los 5 mil genes analizados se obtuvieron 241 alterados respecto al grupo control con valores de Z-score >-2 y $<+2$, de los cuales se cuentan con datos como rno, symdesc y nombre de la proteína codificable, se procedió con la clasificación de rutas con la ayuda de la plataforma Kegg (<https://www.kegg.jp/>), certificada por Kanehisa Laboratories y desarrollada en colaboración del Centro de Bioinformática, Instituto de Investigación Química, Universidad de Kyoto y el Centro del Genoma Humano, Instituto de Ciencias Médicas, Universidad de Tokio (<https://www.kanehisa.jp/>).

Se seleccionaron a los genes que tienen participación en el metabolismo global de tallo-cerebelo del modelo *taiep*, considerando los valores de inclusión propuestos, teniendo un total de 59 con sobre y baja regulación, que fueron contemplados en el análisis con apoyo de la plataforma Reactome.

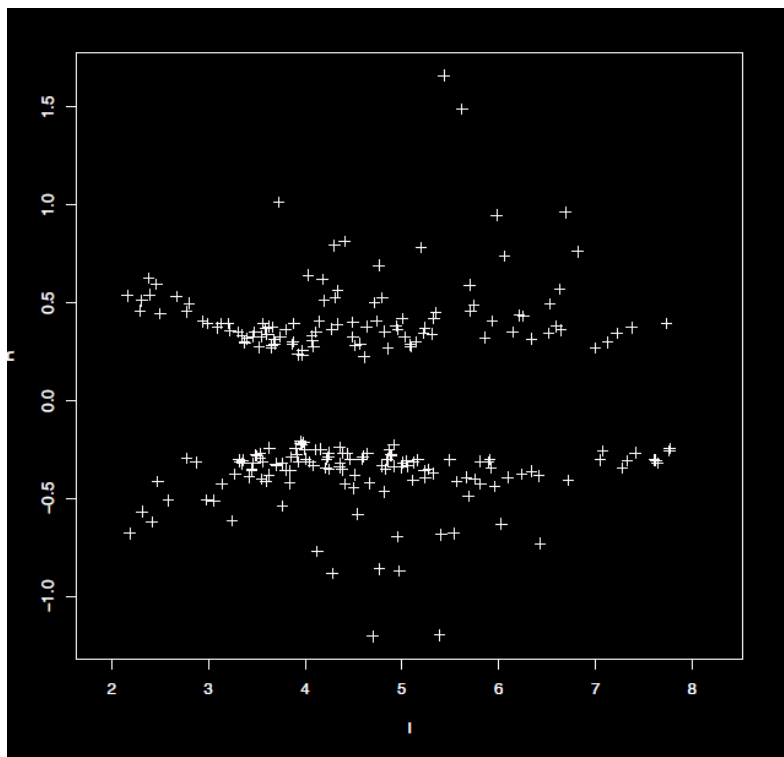


Ilustración 4.

Gráfico de discriminación de valores ≤ -2 y $\geq +2$.

7. Reactome

Para realizar la selección de los genes que tienen relación con el metabolismo de carbohidratos en tallo-cerebelo del modelo *taiep* ingresamos a la página web de la plataforma Reactome (<https://reactome.org/>), funcionando bajo las licencias de Creative Commons Public Domain (CC0) License apply y Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) License (Extraído de: Jassal et. al., 2020).

En la página principal se observan iconos (Pathway Browser, Analysis Tools, ReactomeFIViz y Documentation) que hacen alusión a la función que ejecutan al seleccionar sobre ellos, también se observa un buscador con ejemplos del tipo de código que se puede introducir para realizar la búsqueda (O95631, NTN1, signaling by EGFR, glucose), en nuestro caso contamos con los symdesc (nombre asociado) de cada gen. Si en la página de inicio continuamos desplazándonos hacia abajo, podremos encontrar otros apartados como noticias, Tweets, una descripción breve de la plataforma, la última fecha de actualización, íconos de los mapas con los que cuenta,



reacciones, proteínas, moléculas pequeñas, fármacos y referencias bibliográficas, también se puede encontrar con iconos de apoyo para cualquier duda referente a la plataforma y por último se tiene una sección más de iconos referentes a API y acceso de datos.

Para este estudio nos centraremos en el icono "Pathway Browser", ubicado al inicio de la página web, que permite interactuar y visualizar los mapas bioquímicos biológicos, al seleccionar sobre dicho icono se nos presentara una pantalla con el logotipo de la plataforma, en la que tendremos que esperar a que cargue y seguido a esto se nos presenta una pantalla con diagramas de conexión entre algunos de los muchos mapas presentes en la plataforma, se puede observar una sección llamada "Event Hierarchy" que en forma de lista muestra las vías que conforman a la interfaz en la parte inferior central se puede tener información referente a la descripción, moléculas, estructuras, expresión, análisis y descargas, de rutas, proteínas, o reacciones que seleccionemos. Se puede visualizar un buscador en el que se estarán colocando los symdesc de los resultados.

Antes de iniciar a poner los genes, en el buscador, se debe seleccionar la especie sobre la que queremos tener los mapas resultantes, para ellos se presenta un icono llamado "Pathways for:" en donde se debe seleccionar "*Rattus norvegicus*" con esto, aseguramos que los mapas arrojados serán homologados con la especie de la cual tenemos los resultados del microarreglo.

En el buscador se colocaron los symdesc uno por uno, o datos en conjunto (aquí la plataforma puede arrojar resultados erróneos si un gen está mal escrito o si las siglas son similares a otros genes, por ello es mejor realizar la búsqueda de uno en uno), es importante resaltar que si el gen de búsqueda no tiene relación con la ruta en la que se está visualizando la pantalla, no se arrojarán resultados en "**This diagram**", normalmente los resultados de todas las rutas en donde se tiene participación del gen se verán reflejadas en "**All diagrams**". Una consideración extra, es que, la plataforma no mostró a los genes con baja o sobrerregulación, solo muestra a los genes recalcados en color diferente (rosa), la reacción en la que están involucrados, así como todas las rutas en las que están participando, por ello se debe considerar el análisis

por separado, es decir, analizar por pasos solo a los de baja regulación y después a los de alta regulación.

Al colocar el gen en el buscador se muestra una descripción de las rutas en que la proteína para la que codifica el gen se encuentra participando, en ese caso, si tiene relación con el metabolismo de carbohidratos, como lo es el caso del gen Hk2, que codifica para la Hexoquinasa 2 y fosforila a la glucosa en citosol, en esos casos se selecciona sobre el mapa de interés. Al seleccionar el mapa bioquímico, se observó la ubicación de la proteína, función, reacción en la que participa, metabolitos requeridos, productos de la reacción y localización en la célula.

El algoritmo de la plataforma arrojó los mapas metabólicos en los que están involucrados cada uno de los genes. A partir de estos se seleccionaron 9 que participan en el metabolismo de carbohidratos o guardan una conexión inmediata con esta ruta (Extraído de: Jassal et. al., 2020).

De forma similar se decidió integrar 3 genes más, uno para la sobrerregulación y dos para la baja regulación, que muestran cercanía con los valores de inclusión y contribuyen a la discusión de resultados, por ello al final se optó por la integración de 12 genes en total.

8. CmapTools

Se utilizó la aplicación para PC Cmaptools, herramienta utilizada para la elaboración de mapas conceptuales, y en este caso utilizando ese concepto se elaboró el mapa propuesto para el metabolismo de carbohidratos en tallo-cerebelo del modelo *taiep* (mapa 1).

Para trabajar desde CmapTools, primero se debe descargar el software (<https://cmaptools.softonic.com/>), el programa cuenta con un menú que muestra la sección "archivo" al seleccionar se procede a "nuevo Cmap" e iniciar la construcción del mapa conceptual.

El cambio de color de los recuadros, tamaño de letra, dirección de las flechas, entre otras funciones puede realizarse desde la pantalla emergente "Estilos", que tiene apartados para la fuente, objeto, línea y Cmap.



Sobre la página en blanco se fueron generando cuadros unidos mediante flechas, en cada recuadro se colocó el metabolito relevante y entre cada recuadro se colocó la enzima que cataliza la reacción involucrada, esto se realizó para cada ruta de interés hasta plasmar a todos los 12 genes de trabajo, dando contorno en color verde para los genes que muestran una sobrerregulación, también se incluyó un cuadro extra con la leyenda "Up", para los genes en baja regulación el contraste del cuadro fue en color rojo agregando un recuadro extra con la leyenda "Down", de esta manera se busca hacer más rápida la localización de los genes de interés.

9. Kegg

Kegg es una plataforma bioinformática que utiliza como base algoritmos para dar la integración de los resultados dentro de mapas relacionados a enfermedades. La plataforma permite la búsqueda específica por especies al introducir los genes en digitación para *Rattus Norvegicus* (rno), con esto aseguramos que los genes resultantes sean únicamente los del organismo de interés y no otros que pudiesen resultar parecidos en digitación.

Para trabajar con Kegg debemos ingresar a la página web de la plataforma (<https://www.genome.jp/kegg/>), donde se muestra la interfaz de búsqueda con descripción breve de la plataforma, apartados que describen a los iconos de la sección superior "Kegg", "Databases", "Mapper", "Auto annotation" y "Kanehisa lab", para la integración por rutas debemos seleccionar sobre el icono "Mapper" y a continuación se mostraran nuevas frases debajo del icono de la plataforma, aquí debemos seleccionar sobre "Search".

En este punto tendremos un recuadro grande en color blanco, en el cual van colocados nuestros genes en código rno, para que la plataforma pueda identificarlos como tal debemos escribir "rno" en el recuadro en color blanco ubicado delante de "other org".

Para encontrar la relación con enfermedades se colocaron primero a todos los genes con sobrerregulación y después a los de baja regulación, sobre el recuadro



grande en color blanco, y se seleccionó " Include same as objects" e " Include alias (for hsa and other org modes)" y a continuación "Exec".

El algoritmo de Kegg arroja los resultados de genes relacionados a enfermedades, en donde se puede visualizar cuantos y cuáles son los genes relacionados, de los seis genes introducidos en algunos casos mostraba la relación con una enfermedad en la que solo participaban dos o más genes, en algunas otras enfermedades solo aparecía un gen de los seis introducidos, de esta manera se pudo seleccionar los artículos de interés que mostraron relación con el metabolismo de carbohidratos en tallo-cerebelo.

En este punto, los genes de interés involucrados fueron ubicados en las respectivas rutas metabólicas, un proceso similar a lo realizado en Reactome. Una ventaja del uso de Kegg, es que proporciona la participación de estos genes en rutas bioquímicas de enfermedades.

➤ **Control de calidad**

De forma general:

Transporte adecuado del ARN a la unidad de microarreglos de la UNAM.

Evitar contaminación.

Sin datos del control calidad del microarreglo.

➤ **Medidas de seguridad**

Extracción de tejidos y ARN:

Uso adecuado de equipos y reactivos, utilizando equipo de protección.

Del microarreglo:

Sin datos otorgados.

RESULTADOS:

Las rutas metabólicas de carbohidratos trazadas en las plataformas bioinformáticas (Reactome) que tienen relación con la glucólisis son la ruta de las pentosas fosfato, ruta de Leloir, glucogenólisis, glucogenogénesis, transaminación, ciclo de los ácidos tricarbónicos y cadena transportadora de electrones de cerebelo-tallo. Con lo que se propone el siguiente mapa metabólico (mapa 1) que engloba tanto a genes regulados negativa y positivamente dados por el microarreglo de cinco mil genes Rn5K_05_26 y Rn5K_05_27.

En total se obtuvieron 107 genes con una regulación mayor a la del grupo control (SD) y 134 con baja regulación, dando un total de 241 genes ubicados entre ≤ -2 y $\geq +2$ (Z-score) dados en el análisis con el microarreglo, estos fueron agrupados en el rubro de metabolismo.

El total de genes analizados agrupados para el metabolismo *taiep*, con una Z-score de ≤ -2 y $\geq +2$ fueron 59, de los cuales 27 de ellos correspondieron a genes con baja regulación y 32 a genes con sobrerregulación. Los 59 genes fueron introducidos en la plataforma Reactome, que proporciona los mapas metabólicos en los que se encuentran involucrados cada uno de los genes, obteniendo un total de 9 genes alterados y asociados al metabolismo de carbohidratos, donde 5 mostraron una mayor regulación respecto al grupo control (SD) y 4 una menor regulación de acuerdo con los criterios de inclusión.

De los mapas arrojados por la plataforma Reactome, se construyó el mapa metabólico bioinformático (Mapa 1) representativo para el metabolismo en cerebelo-tallo del modelo *taiep*. Para realizar dicho mapa se utilizó la aplicación CmapTools, aplicación que permite elaborar mapas conceptuales y de fácil manipulación. Los genes descartados no guardan conexión inmediata con el metabolismo de carbohidratos (datos no mostrados).

Los genes considerados para la elaboración del mapa metabólico propuesto fueron 12, esto se debe a que se consideraron 3 genes que no están dentro de los valores de Z-score propuestos, pero que guardan una conexión con el metabolismo de



carbohidratos *taiep* y permiten esclarecer las alteraciones encontradas, de los cuales 6 se encontraron regulados positivamente (tabla 1) mientras que los 6 restantes pertenecen a una regulación negativa (tabla 2). Este análisis nos proporcionó un panorama del metabolismo de carbohidratos, aunque se decidió incluir a un transportador de glucosa, una fosfatasa, transaminasas y genes involucrados en la cadena transportadora de electrones, debido a la conexión directa con el metabolismo y a que muestran una sobre o baja regulación (Mapa 1).

Dentro de los 6 genes con regulación positiva se encuentra la aldolasa de tipo A (*AldoA*) y la enolasa 3 (*Eno3*) que en el metabolismo de carbohidratos participan en la glucólisis, a la par, se encontró el incremento de la regulación de la 6-fosfofructo-2-cinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa 1 (*Pfkfbf*), una enzima bifuncional que mantiene estable los niveles de fructosa-6P. Por parte de la ruta de las pentosas se encontró a la glucosa-6P deshidrogenasa (*G6pd*) con inmediata conexión a la glucólisis. Nuestros resultados nos muestran a dos genes que expresan para transaminasas, elevados, la alanina aminotransferasa 1 (*Tgp*) y aspartato aminotransferasa 2 (*Tgo2*), también se encontró la sobreexpresión del gen de la glutamato descarboxilasa 2 (*Gad2*), que al ser expresado interviene en la síntesis del neurotransmisor GABA.

Uno de los genes que mostraron regulación negativa es el transportador de solutos 2 (*Glut2*) que permite el acceso de glucosa a la célula, además se tiene una baja regulación en el gen que codifica para la hexoquinasa 2 (*Hk2*), enzima que se ubica al inicio de la glucólisis. En la degradación del glucógeno (glucogenólisis) se tiene regulación negativa del gen que expresa a la subunidad catalítica Gamma 2 de la fosforilasa quinasa (*Phkg2*), que tiene una estrecha relación con la subunidad catalítica 1 de la Glucosa-6-fosfatasa (*G6pc*) mostrada también con regulación negativa, esta enzima da pauta a la formación de glucosa en el retículo endoplasmático. Una enzima más con regulación a la baja codifica para una subunidad que participa en la cadena transportadora de electrones, perteneciente a la ATPasa, lo que podría predisponer a alteraciones con la síntesis de ATP en cerebelo-tallo del modelo *taiep*.

Las siguientes tablas muestran a los genes alterados dentro del metabolismo cerebelo-tallo con las rutas en las que tiene participación y los lugares en que catalizan las reacciones del modelo de estudio.

Tabla 1.

Genes en sobreexpresión en el metabolismo cerebelo-tallo del modelo *taiep*

Genes Up					
Symdesc	RNO	Nombre	Participación	Sitio de Rx	Z-score
<i>Eno3</i>	25438	Enolasa 3/2-fosfo-d-glicerato hidrolasa	Glucólisis	Citosol	2.04
<i>G6pd</i>	24377	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	Ruta de las pentosas fosfato	Citosol	2.87
<i>Gad2</i>	24380	Glutamato Descarboxilasa 2	Síntesis y liberación de GABA	Citosol	2.10
TGO2	25721	Aspartato aminotransferasa 2	Transaminasa	Citosol-Mitocondria	5.49
TGP	81670	Alanina aminotransferasa 1	Transaminasa	Citosol	1.72
<i>Pfkfb1</i>	24638	6-Fosfofructo-2-Quinasa/Fructosa-2,6-Bifosfatasa 1	Enzima bifuncional, homeostasis de la glucólisis	Citosol	2.32

Se debe considerar el punto en el que nos ubicamos y ese es en la traducción de genes, es decir el ensamblaje de proteínas aún no está dado y la funcionalidad real de la proteína para este estudio podría tornarse incierta, a pesar de esto podemos tener noción basada en fuentes bibliográficas de lo que podría ocurrir si la baja o alta regulación de los genes mostrados llegasen a ser reproducibles en la síntesis de proteínas del modelo de estudio u otros de enfermedades con afectaciones a nivel de SNC.

La tabla 2 nos ayudó a resumir la alteración que podría presentarse en el metabolismo, si la síntesis de proteínas es directa a la transcripción, dada desde la entrada de glucosa al citosol, su biotransformación en la glucólisis, así como la relación con otras rutas como la galactólisis, los problemas en el almacenamiento y degradación del glucógeno y termina por presentar a posible deficiencia en el funcionamiento de la cadena transportadora de electrones en la síntesis de ATP. Por otro lado, la tabla 1 da indicios de una posible compensación de la glucólisis, del estrés oxidativo y de la síntesis de neurotransmisores, que podrían tratar de solventar los defectos de los genes en baja regulación.

Tabla 2.

Genes en baja-regulación en el metabolismo cerebelo-tallo del modelo *taiep*

Genes Down					
Symdesc	RNO	Nombre	Participación	Sitio de Rx	Z-score
<i>Atp5j</i>	94271	ATP sintasa subunidad de tallo periférico F6	Cadena de electrones	Membrana mitocondrial	-1.96
<i>G6pc</i>	25634	Glucosa-6-fosfatasa Subunidad catalítica 1	Glucosa en el RE	Lumen de RE	-2.05
<i>Galt</i>	298003	Galactosa-1-fosfato uridiltransferasa	Metabolismo de galactosa	Citosol	-2.16
<i>Hk2</i>	25059	Hexoquinasa 2	Glucólisis	Citosol	-2.48
<i>Phkg2</i>	140671	Fosforilasa quinasa Subunidad catalítica Gamma 2	Glucogenólisis	Citosol	-1.94
<i>Slc2a2</i>	25351	Familia de portadores de solutos 2 Miembro 2	Transportador de glucosa 2	Membrana celular	-2.61

El análisis bioinformático de los genes regulados positiva y negativamente fue la base para la construcción del mapa del metabolismo de carbohidratos afectados obtenidos por el microarreglo en la rata *taiep* de 1 mes de edad (Mapa 1).



DISCUSIÓN:

Este estudio nos proporciona un perfil transcripción de los ARNm de los genes relacionados con el metabolismo de la glucosa, donde el microarreglo debe ser confirmado con métodos más cuantitativos como es la PCR en tiempo real o punto final. Además, existen mecanismos de regulación post-transcripcional y traduccional que afecta la síntesis de proteínas y su actividad. Cabe mencionar que en la rata *taiep* existe una alteración en el transporte de proteínas y ARNm en los oligodendrocitos, incluso teniendo a la proteína ensamblada no se puede asegurar que esta sea funcional, o que no sufra degradación por parte de proteosomas (Cramer 2019, Hobert 2008).

La rata *taiep* mostró la regulación negativa de los genes *Glut2*, *Hk2*, *G6pc*, *Phkg2* y *Atp5j* en el microarreglo de cerebelo y tallo cerebral al mes de edad. El análisis bioinformático sugiere que en ambas regiones cerebrales se estaría presentando una baja biodisponibilidad en la reserva de glucosa proveniente del retículo endoplásmico en la ruta de la glucogenólisis a través de la actividad de la glucosa 6-fosfatasa, por lo que la fosforilación de la glucosa mediada por la hexoquinasa 2, codificada por el gen *HK2*, también podría estar limitada y con ello disminuir el rendimiento glucolítico, sin embargo, la fosforilación de la glucosa es mediada principalmente por la hexoquinasa de tipo 1, que muestra expresión constitutiva y mayor afinidad hacia la glucosa (Zheng et. al., 2016).

Los resultados permiten sugerir que la alteración de la dinámica mitocondrial repercutiría en la patología *taiep*, por lo que una vía metabólica alterna podría ser activada. La modificación en el metabolismo de carbohidratos del sistema nervioso central podría contribuir al inicio del deterioro físico en la rata *taiep* al mes de edad. Los resultados muestran la regulación negativa del gen *Slc2a2*, que estaría codificando para el transportador de glucosa 2 (GLUT2). El GLUT2, ensamblado y funcional, muestra una baja afinidad por la glucosa y principalmente trabaja como un sensor de glucosa, por lo que su función en el metabolismo podría ser prescindible, debido a que otros transportadores GLUT1 y GLUT3 no mostraron alteraciones. Tampoco podemos descartar la importancia del GLUT2 (Leturque et. al., 2009), de ser codificado, pues se



ha reportado que en la enfermedad de Alzheimer y la diabetes este se encuentra alterado, con baja expresión (Koepsell 2020), mostrando asociación entre la intolerancia a la glucosa y el desarrollo de la diabetes tipo 2 (Thorens 2015), lo que podría contribuir a la neurodegeneración mostrada en etapas avanzadas de la patología debido a que el metabolismo de glucosa en la materia gris, cerebelo y tallo se encuentra disminuido (Finnsson et. al., 2019).

El GLUT1 es el encargado de capturar la glucosa en el astrocito que posteriormente es interconvertida en una serie de sustratos por actividad de diferentes enzimas hasta llegar a la formación de piruvato (Zheng et. al., 2016). La utilización de la glucosa en el citosol se lleva a cabo a través de diferentes enzimas como la HK1 que tiene similitud con otras (parálogas), en el análisis no se encontró alterada su regulación, siendo la principal enzima encargada de realizar la fosforilación de glucosa en el tallo-cerebro (Zheng et. al., 2016). El patrón de regulación diferencial de su parólogo HK2, se encontraría ligado al proceso de maduración celular (Zheng et. al., 2016). La regulación negativa de la Hk2, en otros modelos, ha sido asociada a la inducción neuroprotectora para contrarrestar la neuroinflamación (Li et. al., 2018), y en procesos inflamatorios y tumorales se observa la inducción de hiperglucólisis que agrava la severidad de ambos estados patológicos (Hitosugi et al. 2009; Patra et al. 2013).

Las diferentes regiones del cerebro muestran preferencia en el consumo celular entre glucosa y fructuosa al ser región-dependiente para el mantenimiento bioenergético. El GLUT2 y la HK2, al ser expresados, son importantes reguladores primarios en el metabolismo de la glucosa, por lo que, de darse la baja expresión de ambas proteínas, conduciría al inicio de estados hipoglucémicos promoviendo la disrupción en la neurocomunicación entre diferentes regiones cerebrales (Pénicaud et. al., 2002). El transportador GLUT2 tiene relativa expresión en el tronco encefálico (Alvarez et. al., 2005), áreas límbicas, especialmente en oligodendrocitos, tanicitos, astrocitos, neuronas y tejido (Arлуison et. al., 2004, Thorens 2015).

La astrocitosis reactiva, aunado a la baja regulación de la Hk2 y Glut2, podría causar un déficit en el consumo de glucosa potenciado por la neuroinflamación que



incrementaría el daño celular en el cerebelo y tallo cerebral reportada en la rata *taiep* (León-Chávez et. al., 2001). Sin embargo, Hk1, Glut 1, Glut3 y SGLT no mostraron diferencias con la rata control, por lo que nos sugiere que el metabolismo está compensado.

Las células de Purkinje en el cerebelo pueden consumir eficientemente a los ácidos grasos ante una deficiencia de glucosa (Funari et. al., 2005). Sin embargo, se ha reportado una deficiencia de lípidos en el cerebro relacionado con la hipomielinización en la rata *taiep* (Eguibar et. al., 2012) que podría estar relacionada con la disfunción y la muerte celular en edades posteriores (Soto-Rodriguez et al., 2012). Los circuitos nerviosos en el tallo cerebral en conjunto con el hipotálamo son centros importantes para el control en la ingesta de alimento, particularmente de glucosa y ácidos grasos (Pénicaud et. al., 2002), lo cual estaría asociado a una deficiencia en la ingesta de alimento aunado a la presencia del problema locomotor en etapas tempranas y adulta (Vargas-Castro et al., 2021).

Lo anterior podría conectar con la ruta de Leloir que aporta sustratos al mantenimiento de la glucólisis y la síntesis de cerebrósidos, mediada por la galactosa que es otro metabolito de aporte energético. Los resultados mostraron que el gen *Galt* está regulado negativamente, donde se estaría guardando una conexión directa con la glucólisis, génesis de cerebrósido y la reducción en la formación de glucosa-1P derivada de la galactosa, también podría presentarse una desregularización sobre la síntesis del UDP-galactosa, un pilar esencial en la síntesis de cerebrósidos como los galactolípidos (Lebea & Pretorius, 2005).

El UDP-galactosa es el metabolito requerido por la enzima cerebrósido galactosiltransferasa (CGT) (Lebea y Proterius 2005), de este modo se estaría afectando la síntesis de galactosilceramida, un sustrato en la mielina compactada y sus derivados sulfatados (sulfatidas), con mayor presencia en mielina no compactada (Maier et. al., 2008), ambos altamente enriquecidos en la membrana plasmática de los oligodendrocitos en tallo-cerebelo (Lebea y Proterius 2005).

Los galactocerebrósidos como la galactoceramida (que contribuye a la formación y estabilidad de la mielina) y glucocerebrósidos como la glucosilceramida,



son los productos principales de la CGT, estos productos abundan en las membranas celulares de varios tejidos a nivel de sistema nervioso central, además de que los galactoesfingolípidos son fundamentales para el mantenimiento de neuronas (Ishibashi et. al, 2002). La reducción en la expresión de la Galt podría contribuir a los procesos de hipomielinización-desmielinización mostrados en la rata *taiep*.

La galactosilceramida no es esencial dado que su ausencia es compensada parcialmente por glucosilceramida (Aggarwal et. al., 2011; Saadat et. al., 2010), en este caso se estarían afectado el metabolismo de ambos lípidos compuestos, solo si es comprobable la deficiencia en los niveles de UDP-galactosa, dichos defectos son evidentes en la reducción del calibre de la vaina de mielina, de acuerdo con lo reportado en modelos con deficiencia de lípidos (Coetzee et. al., 1996; Bosio et. al., 1996).

Por otro lado, el gen PHKG2, que codifica para la fosforilasa cinasa 2 guarda relación con la síntesis y degradación del glucógeno, dicha enzima está encargada de la activación de la glucógeno fosforilasa, por lo que, la deficiencia de dicha enzima estaría directamente asociada a un defecto en el almacenamiento de glucógeno. El PHKG1 no muestra alteración en su regulación siendo este el gen principal, lo que podría contrarrestar el efecto metabólico de la baja regulación de su parálogo *Phkg2*.

Otro gen afectado y asociado a defectos en el almacenamiento de glucógeno es el *G6pc* que codifica para la Glucosa-6-fosfatasa, que, al ser expresado, permite tener glucosa en el lumen del retículo endoplasmático. La G6PC cataliza la desfosforilación de Glc-6P a Glc, siendo clave en la homeostasis de la glucosa al participar en la gluconeogénesis y glucogenólisis. El decremento en la actividad de la G6PC aunado a episodios de hipoglucemia tendrían estrecha relación con problemas en el almacenamiento de glucógeno (Froissart et. al., 2011, Banka y Newman, 2013), solo si realmente se tiene a la enzima codificada y funcional. La glucosa-6-fosfatasa se encuentra expresada en todo el cerebelo, en neuronas grandes del tronco cerebral, en las células de Purkinje del cerebelo y las células piramidales de la corteza cerebral (Stephens et. al., 1976). En cerebelo-tallo, el defecto del almacenamiento de glucógeno, de no existir la expresión de la fosforilasa quinasa 1, podría contribuir a la



modificación de la demanda y manteamiento energético en astrocitos (Psarra et. al., 1998).

La aparente baja disponibilidad de glucosa podría ser compensada por el uso de la reserva energética cerebral, sin embargo, la regulación negativa de los genes *Phkg2* y *G6pc* sugiere que la glucogenólisis podría no tener impacto en el cerebelo y tallo de la rata *taiep* al mes de edad debido a la compensación dada por enzimas como la PFKFB1, G6PD y por las transaminasas en la etapa inicial de las alteraciones del modelo. Aunque, la concentración de glucógeno tiene valores por debajo de los niveles fisiológicos en el cerebro respecto a hígado o músculo esquelético (Nelson et, al., 1968). La PHK y la G6PC son enzimas encargadas de la hidrólisis del glucógeno (Marandel et. al., 2017). La depleción del gen *Phkg2* y deficiencia del gen *G6pc* (Froissart et. al., 2011) podría estar directamente asociados a la baja actividad enzimática y por lo tanto, relacionados con un defecto en el almacenamiento y uso del glucógeno (Gibson et. al., 2021) aunque es importante tener presente que el *Phkg2* es solo un parálogo del *Phkg1*. El déficit de glucógeno tisular muestra un comportamiento diferencial en función del estatus glicémico y la actividad neuronal de la región necesario en aporte bioenergético en el cerebelo y el tallo cerebral (Matsui 2021).

Por otro lado, los genes *Pfkfb*, *Eno3*, *Tgp*, *Gad2*, *G6pd* y *Tgo2* muestran una regulación positiva en la rata *taiep* de 1 mes de edad. Por lo que, si se presenta una reducción en el consumo y fosforilación de glucosa, o una baja disponibilidad de la reserva de glucógeno se estaría conduciendo a la activación de otras rutas metabólicas con la finalidad de mantener el flujo metabólico en tallo-cerebelo de la rata *taiep*.

Una ruta alterna para la obtención de monosacáridos podría ser a través de derivados de la fructosa. La consideración del metabolismo primario de la glucosa con aumento en la regulación de los genes de algunos puntos de la glucólisis nos permite considerar la existencia de compensaciones que permitirían la formación de piruvato en la glucólisis. Esto podría ser explicado gracias a la sobrerregulación de *Pfkfb1*, gen que estaría codificando para la 6-fosfofructo-2-cinasa/fructosa 2,6-bifosfatasa 1 (*Pfkfb*), la cual es una enzima reguladora de la homeostasia de la glucosa, y que de



forma basar es la encargada de mantener los niveles adecuados de fructosa-6P ante una demanda por parte del metabolismo glucolítico (Minchenko et. al., 2003). La regulación positiva de *Pfkfb*, podría dar el incremento de los niveles de fructosa-2,6-bisfosfato y con esto llevaría a la conservación y activación de la glucólisis en tallo-cerebelo. Esta alza podría también promover la actividad enzimática de reacciones siguientes, como la mediada por la aldolasa que en condiciones basales cataliza la interconversión de fructosa-1,6 di-P hacia gliceraldehído-3P y dihidroxicetona-3P, esto podría ser modulada si se presenta una sobre actividad por parte de la enzima PFKFB (Alvarez et. al., 2021) a pesar de no haberse encontrado alteración en este gen, o no al menos dentro de los criterios de inclusión.

El gen *Eno3* podría estar codificando la enzima enolasa 3, que utiliza el 2-fosfoglicerato para llevar a cabo la formación del fosfoenolpiruvato. La sobre regulación de *Eno3* podría indicar que la formación de piruvato mantiene el flujo metabólico en tallo-cerebelo, aunque no se considera como la principal enolasa dado que muestra expresión en regiones definidas. La enolasa 3 es expresada exclusivamente en los astrocitos cerebelares (Langley & Ghandour 1981) y en el tallo cerebral (Francis et. al., 1983). Particularmente, en condiciones inflamatorias (Hirai 2017) como astrocitosis reactiva (Francis et. al., 1983) similar a la reportada en la rata *taiep* desde edades temprana en ambas regiones cerebrales, lo que podría representar un aporte metabólico constante relacionado con la reactividad inmunológica. La actividad de la enolasa no específica de neurona (enolasa 3) cambian por la enolasa específica de neurona (la isoforma 2 sobre la 1) en función del estado de desarrollo tisular y de la expresión diferencial entre el cerebelo y el tallo cerebral (Marangos et. al., 1980).

Uno de los destinos del piruvato es la formación de α -KG a través de la alanina aminotransferasa 1 (TGP). En el presente estudio se encontró la sobre regulación del gen *Gtp*, lo que supondría el incremento en la síntesis de la aminotransferasa que promovería la degradación de compuestos aminados a través de la formación de alanina. Mientras que el gen *Tgo2* que codifica para la aspartato aminotransferasa podría ceder oxalacetato en el ciclo de los ácidos tricarbónicos, además se podría



considerar cierta interacción con el funcionamiento de la malato deshidrogenasa al permitirse la activación de la lanzadera malato-aspartato buscando el mantenimiento de los niveles de NAD^+ y con ello la participación de forma indirecta en la glucólisis (Yang et. al., 2015). Por otro lado, los genes *Tgp* y *Tgo2* podrían participar de manera activa en la síntesis de glutamato, mientras que el gen *Gad2* estaría siendo el responsable en la síntesis de GABA a partir del glutamato, considera así, dado el aumento en el tono glutamatérgico demostrado por Fuenzalida y cols en el 2009. También se ha reportado que, en ratas de un mes de edad, el incremento del metabolismo oxidativo favorece la síntesis de neurotransmisores en el cerebelo en condiciones fisiológicas (Melo et. al., 2007), tomando esta idea, se podría considerar que la sobreexpresión de estos genes está por encima de los estados basales del grupo control y se estaría buscando la compensación de las anomalías fenotípicas en las primeras etapas mostradas en la patología *taiep*.

El cerebelo y el tallo cerebral dependen del funcionamiento del ciclo α -KG/glutamato/GABA participando en la neuroplasticidad y comunicación entre ambas regiones (Amore & Bonavita, 1965; Arckens et. al., 2000), permitiendo participar en el control de habilidades motoras (Sánchez-Campusano et. al., 2009; Manto et. al., 2012). Así la sobreexpresión de los genes *TGP*, *Gad2* y *TGO2*, de codificar para sus respectivas enzimas, podrían tener una interrelación directa sobre la regulación en el metabolismo de glutamato/ α -KG/GABA en la neurona y el astrocito en una etapa temprana del desarrollo cerebral. Lo que podría estar dando el incremento de las transaminasas (*GTP* y *TGO*) y con ello se promoverían la interconversión del glutamato a α -KG que estaría manteniendo el aporte bioenergético (Benuck et. al., 1972; Benuck & Lajha 1975). Además, en conjunto con la *GAD2* se podría colaborar en la síntesis de GABA (MacDonnell & Greengard., 1974). Algunos estudios han indicado que en la rata *taiep* existe un incremento del tono glutamatérgico (Fuenzalida et. al., 2009), por lo que la actividad de *TGO2* podría estar incrementada al considerar dichos estudios.

La rata *taiep* comienza a mostrar afecciones motoras al primer mes de edad relacionadas con el incremento de la neuroinflamación (Soto-Rodriguez et. al., 2015)



lo que permite la alteración motora que la rata presenta a lo largo de su vida (Cortés et. al., 2005). La desregulación en el metabolismo del glutamato causa lesiones cerebrales por excitotoxicidad (Mohebiany & Schneider, 2013), mientras que el tallo cerebral es susceptible a daño por asfixia y a modificaciones en su metabolismo (Peng et. al., 1994). El incremento en la actividad de las transaminasas (TGP y TGO) ha sido relacionado tanto a la astrocitosis reactiva como a la proliferación requerida por la demanda energética (Francis et. al., 1983).

En la ruta de las pentosas encontramos un aumento en la regulación del gen *G6pd* que podría estar codificando a mayor concentración de la glucosa-6-P deshidrogenasa y con ello catalizar la conversión de glucosa-6P hacia glucono-1,5-lactona 6-P, al mismo tiempo siendo capaz de sobre generar NADPH, importante cofactor que participa en detener el estrés oxidativo. Las células inmaduras pueden activar programas metabólicos que les ayuden a definir su destino y estadio celular (Shyh-Chang et. al., 2013). La activación de rutas alternas a las clásicas como lo podrían indicar los resultados del microarreglo en el cerebelo y tallo cerebral. Así la *G6pd* podría colaborar como un centro de control para la activación de la vía de las pentosas. La enzima G6PD, de ser expresada correctamente y funcional, estaría actuando como sensor redox, encargado de producir NADPH para contribuir en el rendimiento del sistema glutatión peroxidasa-glutatión reductasa y a la protección del ADN (Arese et. al., 2012), sugiriendo su participación en la defensa antioxidante durante la proliferación neuronal en la rata *taiep* al mes de edad. La G6PD ejerce un papel protector ante el daño oxidativo en las células de Purkinje y en diferentes regiones del tallo cerebral, lo cual podría retrasar la pérdida de las habilidades motoras (Loniewska et. al., 2020; Mejías et. al., 2006).

La ruta de las pentosas también muestra relación con la síntesis de ribosa que se integra como aminoácidos y sensor en la producción de bases nitrogenadas, durante este proceso se obtienen derivados como la fructosa-6-fosfato y el gliceraldehído-3-fosfato que estarían incrementados e integrados a la glucólisis.

Por último, en la ruta final del metabolismo energético, la ATP sintasa podría disponer de una alteración. El microarreglo nos muestra la regulación negativa del gen



Atp5j, que codifica para la subunidad F6 del tallo estático F0, además este es blanco mitocondrial relacionado con enfermedades neurodegenerativas (Hu et. al., 2020, Pei & Wallace et. al., 2018). La baja regulación de este gen en la cadena transportadora de electrones se podría estar correlacionando con una disminución en la traducción de los componentes de la ATP sintasa (Maier et. al., 2009; Vogel & Marcotte et. al, 2012) confiriendo inestabilidad y posiblemente alteraciones en la producción de ATP en etapas posteriores de la vida *taiep*, lo que podría estar contribuyendo a la muerte celular inducida por la caspasa 3 (Soto-Rodríguez et. al., 2012).

Resultados previos no publicados, de pruebas bioquímicas realizadas al primer, tercer y sexto mes de edad, a cargo de Treviño-Mora y cols., demuestran el aumento de glucosa, en la actividad de TGO y TGP, de estas transaminasas se encontraron los transcritos regulados positivamente por lo que se sugiere que estarían codificando para dichas proteínas de acuerdo al microarreglo, con mayor Z-score para TGO y menor Z-score para la TGP, también se reportó un aumento en la Enolasa de tipo neuronal, de la que se tiene una regulación positiva para la Eno3. Estos resultados estarían apoyando lo obtenido con el microarreglo donde el tejido cerebral estaría proporcionando otros metabolitos derivados de otras vías metabólicas para mantener el aporte energético. Además, el ciclo glutamato-glutamina-GABA juega un papel importante en el desarrollo cerebral, así como en cerebelo-tallo, incrementando la comunicación y maduración neuronal. Sin embargo, el incremento de este mecanismo podría proporcionar a largo tiempo un daño por excitotoxicidad, desencadenando el daño cognitivo-motor observado previamente (Vargas-Castro et al., 2021), debido a la liberación asincrónica de glutamato a las edades P7-P30, por una conexión aberrante de contactos sinápticos (Fuenzalida et, al., 2009).

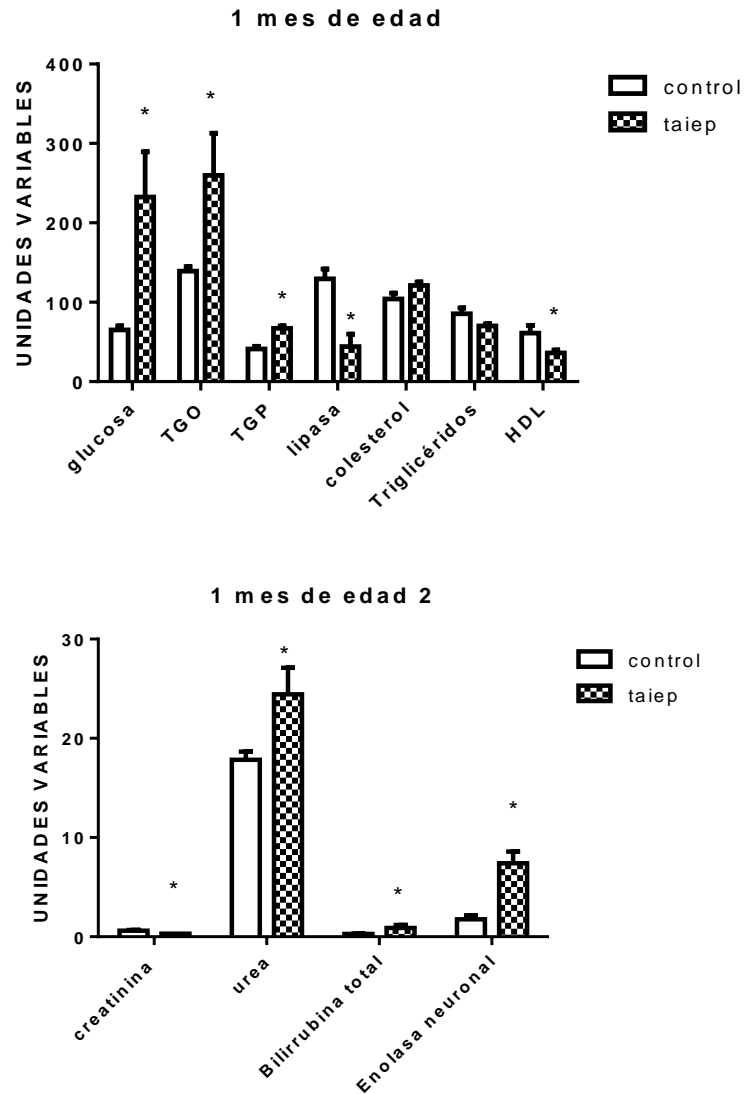


Ilustración 5.

Evaluación Bioquímica en la rata *taiep*, resaltando el aumento de la concentración de glucosa, TGO, TGP, urea, bilirrubina total y enolasa neuronal, con decrementos en lipasa, HDL y creatinina.

Es necesario llevar a cabo más experimentos que ayuden a dilucidar el papel de cada uno de los genes y el impacto que llegarían a tener sobre el metabolismo *taiep* mostrado en tallo-cerebelo, para ello los genes analizados en este trabajo pueden ser propuestos como blancos moleculares de la patología. Así mismo se recalca que los genes mostrados podrían no estar representados proteicamente igual, aunque por los



datos bibliográficos recopilados tampoco se puede descartar la importancia de todos ellos para estudios posteriores.

Para más información acerca de los genes mostrados con alteración en la ruta de carbohidratos de tallo-cerebelo y cercanos a la glucólisis, se puede consultar el "ANEXO I. Definiciones", ubicado antes de la bibliografía.

CONCLUSIÓN

Con el análisis bioinformático del metabolismo de carbohidratos en el perfil de regulación de genes en tallo-cerebelo de la rata *taiep* al mes de edad, se propone un mapa bioinformático de las rutas metabólicas de carbohidratos y vías alternas, a partir del mismo se resaltaron los genes afectados en la patología *taiep*.

Los resultados sugieren que la regulación negativa de Glut2 conllevaría a una falla en la regulación de glucosa extracelular, produciendo un incremento de esta, donde el sistema de regulación positiva de *Pfkfb1* compensaría la afectación involucrada en el proceso de glucólisis y de la G6pc en la glucogenólisis. Los resultados de las transaminasas sugerirían que el metabolismo muestra dirección hacia el aporte energético, pero más hacia la formación de glutamato, respaldado por autores y estudios bioquímicos internos. Sin embargo, la regulación negativa de *Atp5j* podría afectar la síntesis de *ATP*, que en cierto momento podría contribuir a la activación de caspasa-3 y muerte celular observado desde etapas tempranas (Soto-Rodríguez et.al., 2012). La mutación de la tubulina beta4 que presenta la rata *taiep* podría contribuir a la variación en la regulación de carbohidratos.

La hipomielinización en la rata *taiep* estaría causando un desorden en el aporte energético, que podría contribuir al aumento de los niveles de glucosa y metabolitos como glutamato, glutamina, GABA, piruvato, alanina, oxalacetato y alfa-cetoglutarato a nivel de ciclo de Krebs, sugiriendo que contribuye a la compensación en el metabolismo energético o a la alteración neuroquímica en etapas tempranas del modelo *taiep*.



PERSPECTIVAS

1. Realizar un análisis bioinformático de las vías metabólicas de lípidos y aminoácidos.
2. Validar los transcritos a través de una PCR tiempo real
3. Realizar un seguimiento de los transcritos de los genes afectados a lo largo de la vida
4. Evaluar los niveles de proteínas a través de ensayos inmunológicos (ELISA, Wester Blot e inmunohistoquímicos) o actividades enzimáticas los genes afectados.
5. Analizar los niveles de ADP-ATP por medio de HPLC o kits
6. Evaluar los niveles de Glutamato, GABA, Glutamina, piruvato, alanina, oxalacetato y alfa-cetoglutarato
7. Evaluar la Galactosa 1 fosfato Uridililtransferasa en donde correlacionaría con la síntesis de galactolípidos que impactan estructuralmente sobre la mielina



ORGANIZACIÓN

Recursos humanos

D.C. Bertha Alicia León Chávez

M.C. Alejandro González Vázquez

M.C. Ana Karina Aguilar Peralta

pQ.F.B. Emmanuel Othón Higuera

pQ.F.B. Melissa Alejandra Grajales Santiago

Recursos materiales

Ratas *taiep*

Chip de microarreglos

Computadora

Recursos financieros

Apoysos de proyectos VIEP (en el inicio del proyecto).

APÉNDICES

- Cédula de recolección de datos

No aplica

- Tablas

No aplica

- Esquemas

No aplica

- Insertos

No aplica

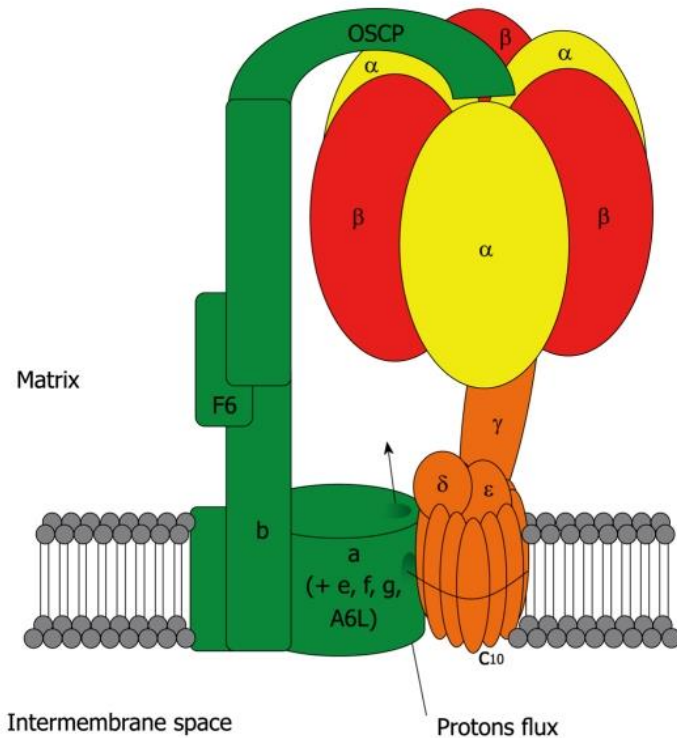
ANEXO I. Definiciones

- Descripción de los genes evaluados

Los genes (symdesc) enlistados y descritos a continuación participan en el metabolismo tallo-cerebelo del modelo *taiep* y mostraron alteración en el estudio :

Atp5j. ATP sintasa subunidad de tallo periférico F6, Mitocondrial.

La ATP-asa, formada por los complejos de multisubunidades, F1 y F0, tiene participación en la respiración oxidativa, donde sintetiza ATP en la mitocondria. La unidad F0 está asociada a la membrana mitocondrial (estática), utiliza un gradiente de protones generado a partir de los componentes de la cadena respiratoria (complejo I, II, III, IV, ubiquinona y citocromo c), este gradiente electroquímico impulsa la rotación del tallo central (F1) (Vantourout et. al., 2010), comprende al canal de protones y consta de nueve subunidades a, b, c, d, e, f, g, F6 y 8, el gen *Atp5j* codifica la subunidad F6 del complejo F0, esta unidad es necesaria para las interacciones F0 y F1 (Collison et. al., 1994), la unidad F1 (parte soluble) corresponde al núcleo catalítico que funciona de manera rotatoria, tomada del gradiente de concentración obtenido de la cadena respiratoria y consta de 5 subunidades, alfa, beta, gamma, delta y épsilon, ensambladas 3 alfa, 3 beta (rotatoria-sintética) heterodímeros que cambian su conformación llevando a la síntesis de ATP a partir de ADP y un solo representante de las otras 3 (rotatoria) (Engeleen-Leen et. al., 2016, Collison et. al., 1994).

**Ilustración 6.**

ATPasa mitocondrial, fracciones F1F0, complejo constituido por 16 subunidades, donde las subunidades α β corresponden a la actividad sintética de ATP (amarillo-rojo), γ , δ , ϵ y el anillo c dan la acción rotatoria (naranja) y la parte fija corresponde a las subunidades a, e, f, g, A6L, b, F6, d y OSCP (verde) (Extraído de Vantourout et. al., 2010).

Eno3. Enolasa 3, 2-fosfo-d-glicerato hidrolasa.

La enolasa forma parte de una familia de enzimas que tiene tres isoenzimas. La enolasa 1 tiene una conformación $\alpha\alpha$, la 2 una conformación $\alpha\beta$ y la enolasa 3 una $\beta\beta$, por lo que esta última también es conocida como enolasa β (Muller et. al., 2012, Peshavaria y Day, 1991). La enolasa 3 (*Eno3*) se puede encontrar en tejidos neuronales, neuroendocrinos, pero principalmente en músculo, participa en la glucólisis (Ho et. al., 2010). La enolasa 3 se localiza en el citosol y cataliza la formación de fosfoenolpiruvato (PEP), un sustrato con elevado potencial de transferencia del grupo fosforilo, a partir de la deshidratación del 2 – fosfoglicerato, durante la reacción existen un intermediario (enólico) que es estabilizado por Mg^{2+} (Nelson & Cox 2009).

G6pc. Glucosa-6-fosfatasa Subunidad catalítica 1.

El gen *G6pc* codifica a la Glucosa-6-fosfatasa subunidad 1, forma parte de la familia de las fosfatasa. Es una enzima clave en la homeostasis de la glucosa, se

encuentra formada una subunidad catalítica (*G6pc*, *G6pc2* o *G6pc3*). Esta es una proteína transmembranal del retículo endoplasmático (RE) con el sitio activo dirigido a la luz del retículo endoplasmático, participa en la glucogenólisis y gluconeogénesis (Froissart et. al., 2011), puede generar glucosa a partir de glucosa-6P teniendo actividad a la par de un conjunto con transportadores transportadores de glucosa-6P (SLC37A4) y transportadores de glucosa (GLUT2) (Vander-Kooi et. al., 2005). La glucosa-6-fosfatasa muestra poca especificidad por lo que puede hidrolizar ésteres fosfóricos y pirofosfato (Arion et. al., 1975; Burchell & Waddell, 1991), es inhibida por glucosa 6-P y pirofosfato (PP_i) (van Schaffingen & Gerin et. al., 2002).

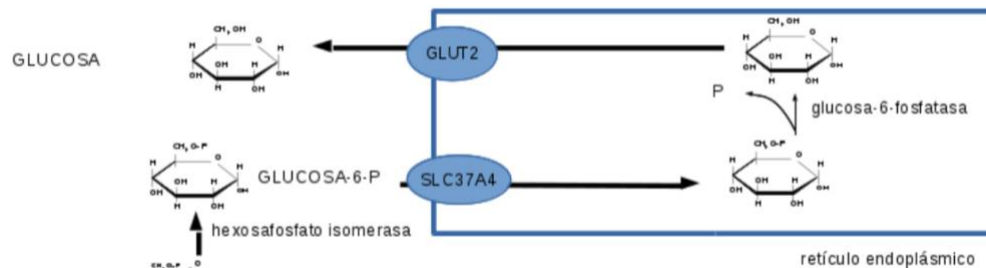


Ilustración 7.

Función de la glucosa 6-fosfatasa ubicada en el lumen del retículo endoplasmático

(Extraído de Rigalli 2016).

***G6pd*.** Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (*G6pd*) es una enzima citoplasmática, puede degradar glucosa o pentosas, participa en la fase oxidativa de la ruta de las pentosas-fosfato en el citosol, con la cual es considerada como una enzima limitante en el funcionamiento de esta ruta metabólica (Pacheco et. al., 2015). Esta enzima catalizando la formación de glucono-1,5-lactona 6-P a partir de glucosa – 6P, predisponiendo el inicio de la ruta con la producción de dos NADPH, un proceso necesario para activar mecanismos antioxidantes (Warburg y Walter 1932).

Gad2. Glutamato Descarboxilasa 2.

Este gen codifica para la enzima citosólica glutamato descarboxilasa 2 (GAD2), solo hay dos miembros de esta enzima (Dade et. al., 2020). La GAD2 cataliza la formación de ácido gamma-aminobutírico (GABA), un neurotransmisor inhibitor, a partir del ácido L-glutámico (Glutamato), neurotransmisor excitador (Brinschwitz et. al., 2010). La GAD2 puede asociarse a la membrana plasmática y a membranas vesiculares permitiendo el empaquetamiento de GABA en la sinapsis neuronal (Jin et. al., 2003). Es altamente expresada en etapas postnatales y es responsable de la síntesis súbita de GABA requerida para la transmisión sináptica (Daif et. al., 2018), tiene mayor presencia en las vesículas que en el citosol (Solimena et. al., 1993), por lo que se expresa mayormente en los extremos presinápticos de terminales nerviosas (Dade et. al, 2020)..

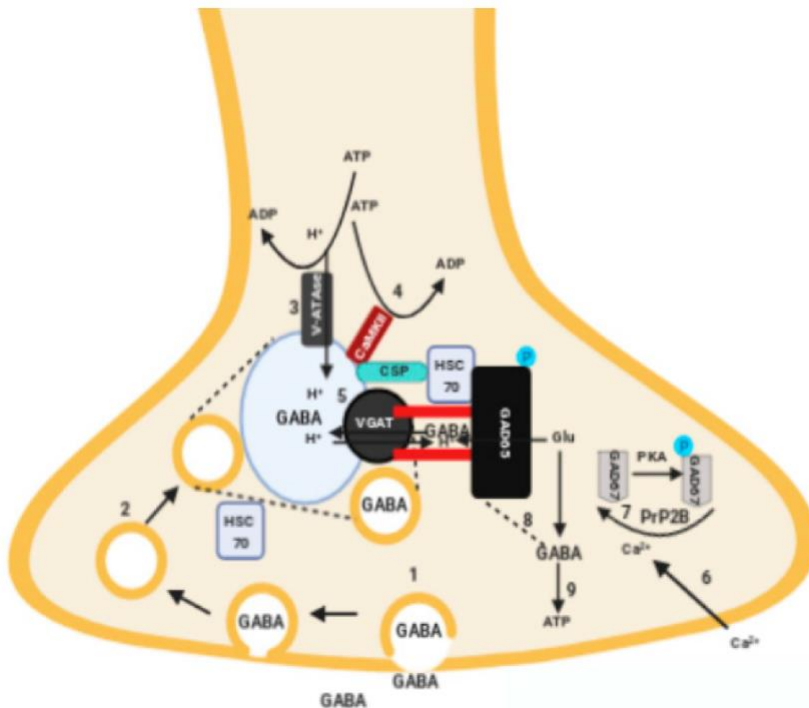


Ilustración 8.

Acoplamiento de síntesis y transporte de GABA donde Gad2 (Gad65) se ancla a las vesículas sinápticas a través de un complejo formado por chaperonas (HSC70), proteína de cadena de cisteína (CSP), transportador vesicular de GABA (VGAT) y la proteína quinasa calcio/calmodulina (CaMKII) (Extraído de Dade et al., 2020).

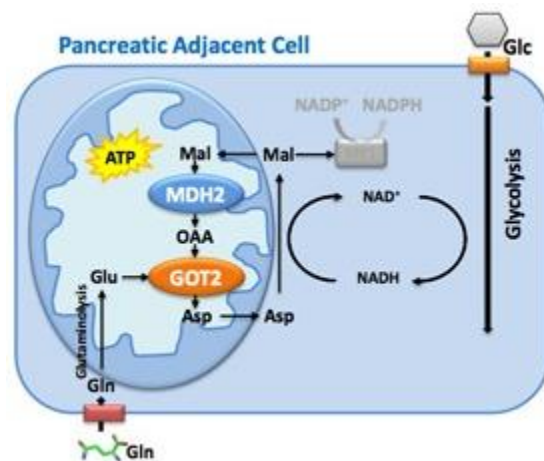
TGO2. Aspartato aminotransferasa 2 (AST).

Este gen codifica a una de las dos transaminasas más conocidas, la aspartato aminotransferasa 2 (TGO2) o transaminasa glutámico-oxaloacética, participa en la transferencia de un grupo amino usando un par de cetoácidos y dando la formación de 2-oxoglutarato y aspartato a partir de oxalacetato y glutamato. La TGO2 se ubica tanto en citosol como en la mitocondria, participa como una especie de puente para mantener el equilibrio redox (NADH) intracelular a través del funcionamiento de la malato deshidrogenasa (MDH) y la lanzadera malato-aspartato, logrando tasas glucolíticas estables (Yang et. al., 2015). La TGO2 participa en la absorción de ácidos grados libres de cadena larga (Van Karnebeek et. al., 2019).

Ilustración 9.

Lanzadera Malato-Aspartato, en participación con TGO2 y MDH

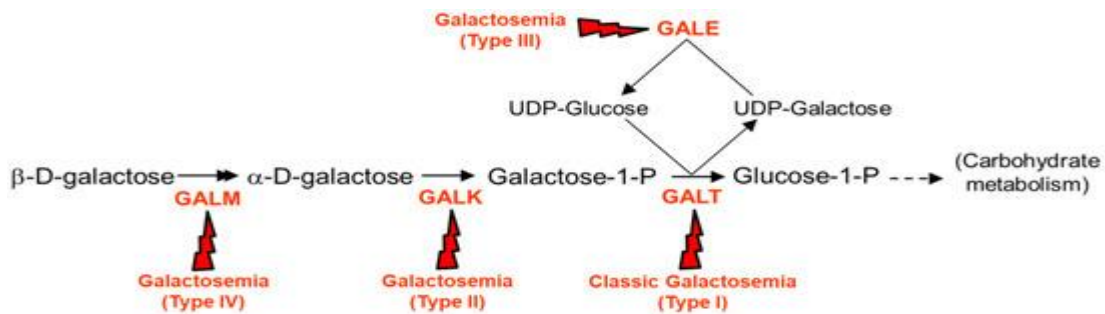
(Extraído de Yang et. al., 2015).



Galt. Galactosa-1-Fosfato Uridililtransferasa:

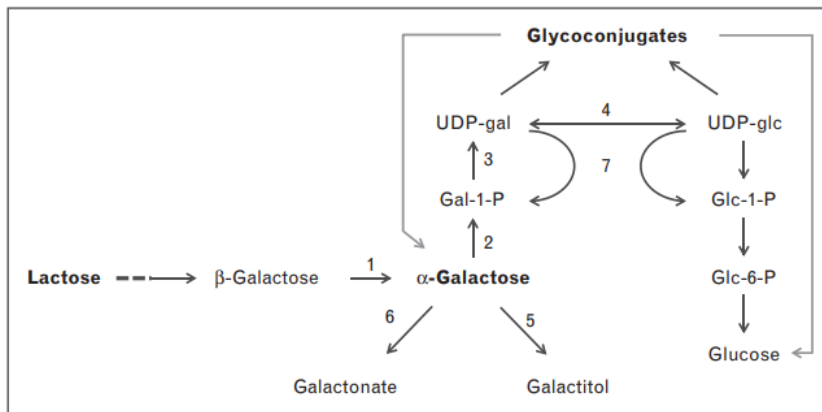
Durante la ruta de Leloir (galactólisis) se da la única interconversión biológica de galactosa y glucosa (Lebea & Pretorius, 2005), esto en el segundo paso de la galactólisis que es catalizada por la galactosa-1-fosfato uridililtransferasa, enzima homodimérica con dos sitios activos (fracción UMP) (Verdino et. al., 2021), aunque para algunos autores este es el tercer paso, en donde se da la conversión de UDP-glucosa y galactosa-1-fosfato a glucosa-1-fosfato y UDP-galactosa, los defectos en este gen pueden resultar en galactosemia a nivel sistémico debido a la acumulación de galactosa y galactosa-1-fosfato (Verdino et. al., 2021), algunos de los síntomas a largo plazo son ataxia y coeficiente intelectual bajo (Lebea & Pretorius, 2005), esta

enzima pertenece a la superfamilia de la tríada de histidina por lo que funciona como hidrolasa o transferasa de nucleótidos (Holden et. al., 2003).



10.1. Enfermedades asociadas a defectos mostrados en las enzimas marcadas

(extraído de Verdino et. al., 2021).



10.2. Destinos del metabolismo de la galatosa (extraído de Coelho et. al., 2015)

Ilustración 10.1. y 10.2

Vía Leloir (Galactólisis) en donde la enzima Galt participa en la tercera o segunda (dependiendo del autor) reacción dando formación a la glucosa-1-fosfato.

TGP. Alanina aminotransferasa 1 (ALAT):

El gen *Gtp* es responsable de la codificación de la transaminasa Alanina aminotransferasa 1, también conocida como glutamato-piruvato transaminasa, se localiza en el citosol y mitocondrias. La GTP cataliza la formación reversible de glutamato y piruvato a partir de 2-oxoglutarato y alanina, formando parte del metabolismo intermedio de glucosa y aminoácidos (Sakagishi, 1995). Está

transaminasa aumenta en condiciones asociadas a la gluconeogénesis y al catabolismo, mientras que se ve disminuida en procesos anabólicos (Vedavathi et. al., 2004).

Hk2. Hexoquinasa 2.

El gen *Hk2* codifica a la hexoquinasa 2 localizada en la membrana externa de las mitocondrias, la regulación de este gen es dependiente de insulina, el parálogo de esta enzima es la hexoquinasa 1 (*Hk1*). En el ser humano se encuentran cuatro isoformas diferentes (I – IV) donde la isoforma IV es una glucosidasa (Tan y Miyamoto, 2015) y muestra mayor preferencia por el ATP intramitocondrial (Arora & Perdensen, 1998). Las cuatro enzimas son de tipo citosólicas solubles, tienen amplia distribución y están encargadas de la fosforilación de una amplia variedad de monosacáridos como la glucosa, manosa o fructosa, su cofactor enzimático es el Mg_2^+ , se forma el complejo $MgATP^{2-}$ (sustrato) para llevar a cabo la reacción irreversible por lo que es un sitio de control de la glucólisis (Nelson & Cox 2009).

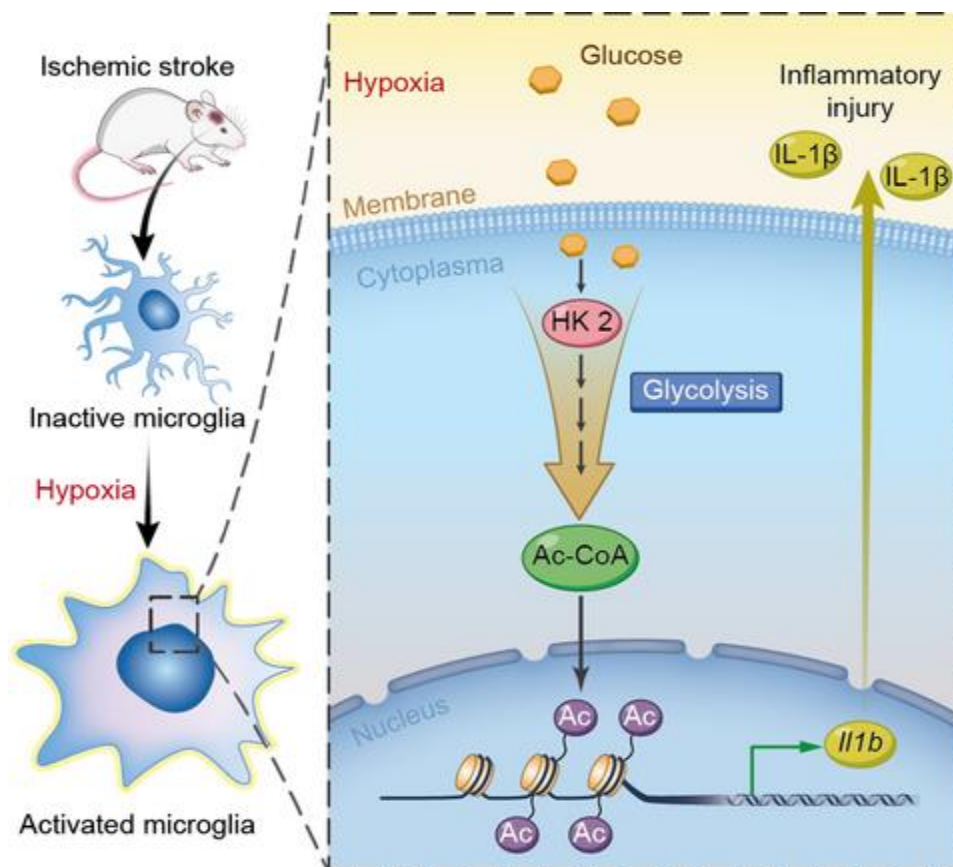


Ilustración 11.

La sobreexpresión de HK2 promueve la síntesis de Acetil-CoA dando la posterior acetilación de histonas y activación de la interleucina (IL)1-β resultando en procesos inflamatorios en la hipoxia cerebral (Extraído de Li et. al., 2018).

***Pfkfb1***. 6-Fosfofructo-2-Quinasa/Fructosa-2,6-Bifosfatasa 1.

La 6-Fosfofructo-2-Quinasa/Fructosa-2,6-Bifosfatasa 1 es una enzima bimodal, funciona como un activador de la glucólisis pues activa a la fosfofructoquinasa e inhibidor de la gluconeogénesis, inhibiendo a la fructosa-1,6-bifosfatasa, por lo que se puede considerar como un regulador de la homeostasis de la glucosa (Cosin-Roger et. al., 2013). Esta enzima se localiza en el y citosol participa en la formación de fructosa–2,6–bifosfato, este metabolito tiene un papel crítico, pues al tener un aumento favorece al flujo glucolítico (Lee et. al., 2003), la enzima al tener sitios catalíticos independientes también da formación de la fructosa–1,6–bifosfato que se integra a la glucólisis (Minchenko et. al., 2003).

Phkg2. Fosforilasa quinasa Subunidad catalítica Gamma 2.

La fosforilasa quinasa (PHK) es una holoenzima que activa a la glucógeno fosforilasa. La PHK está conformada por cuatro subunidades (α , β , γ y δ) codificadas por los genes *Phka2*, *Phkb*, *Phkg2* y *Phka1*. La subunidad γ otorga la función a la enzima que participa en la predisposición celular ante problemas en el almacenamiento de glucógeno, codificadas por (Waheed et. al., 2020). El gen *Phkg2* codifica para la subunidad gamma, dicha subunidad alberga el sitio activo de la enzima y para que se lleve a cabo la primera reacción de la glucogenólisis el complejo de la fosforilasa está formada por las subunidades alfa, beta, gamma y delta lo que le permite ser activamente funcional. El gen parálogo es el *Phkg1* (*Fosforilasa quinasa Subunidad catalítica Gamma 1*) (Li et. al., 2018).

Slc2a2. Familia de portadores de solutos 2 Miembro 2.

El gen *Slc2a2* codifica para el transportador integral de glucosa tipo 2 (GLUT2) presente en la membrana plasmática. Es un transportador de glucosa de tipo bidireccional, con baja afinidad y alta capacidad a la glucosa por lo que se sugiere como un sensor de glucosa (Thorens, 2015) sensible a altas concentraciones glucosa, fructosa y galactosa (Leturque et. al., 2009), con un Km (50 mmol/L) y Vmax elevados.



Este transportador no es insulino dependiente (Sandoval-Muñiz et. al., 2015) sin embargo es el único que permite una producción normal de insulina en respuesta a la glucosa (Hughes et. al., 1993). El transportador SLC2A2 contribuye a la detección de glucosa (Thorens 2001), de esta forma no solo contribuye a las rutas metabólicas sino también a desencadenar señalización de proteínas (Leturque et. al., 2009).



BIBLIOGRAFÍA:

Aggarwal S., Yurlova L., Simons M (2011). Central nervous system myelin: Structure, synthesis and assembly. *Trends Cell Biol.* 21:585–593.

Altman, J. (1982). Morphological development of the rat cerebellum and some of its mechanisms. *Experimental Brain Research, Suppl*, 6, 9–48.

Altman, J., & Das, G. D. (1966). Autoradiographic and Histological Studies of Postnatal Neurogenesis I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. *The Journal of Comparative Neurology*, 126, 337–390.

Alvarez E, Martínez MD, Roncero I, Chowen JA, García-Cuartero B, Gispert JD, Sanz C, Vázquez P, Maldonado A, de Cáceres J, Desco M, Pozo MA, Blázquez E (2005). The expression of GLP-1 receptor mRNA and protein allows the effect of GLP-1 on glucose metabolism in the human hypothalamus and brainstem. *J Neurochem.* 92(4):798-806.

Alvarez R, Mandal D, Chittiboina P (2021). Canonical and Non-Canonical Roles of PFKFB3 in Brain Tumors. *Cells.* 10(11):2913.

Alvestad S, Hammer J, Qu H, Håberg A, Ottersen OP, Sonnewald U (2011) Reduced astrocytic contribution to the turnover of glutamate, glutamine, and GABA characterizes the latent phase in the kainate model of temporal lobe epilepsy. *J Cereb Blood Flow Metab* 31:1675–1686.

Amore G, Bonavita V (1965). Aspartate aminotransferase in the brain of the developing rat. *Life Sci.* 4(24):2417-24.

Arckens L, Schweigart G, Qu Y, Wouters G, Pow DV, Vandesande F, Eysel UT, Orban GA (2000). Cooperative changes in GABA, glutamate and activity levels: the missing link in cortical plasticity. *Eur J Neurosci.* 12(12):4222-32.



Arese P, Gallo V, Pantaleo A, Turrini F (2012). Life and Death of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) Deficient Erythrocytes - Role of Redox Stress and Band 3 Modifications. *Transfus Med Hemother.*39(5):328-34.

Arion WJ, Wallin BK, Lange AJ, Ballas LM (1975). On the involvement of a glucose 6-phosphate transport system in the function of microsomal glucose 6-phosphatase. *Mol Cell Biochem*; 6: 75 - 83.

Arluison M, Quignon M, Nguyen P, Thorens B, Leloup C, Penicaud L (2004). Distribution and anatomical localization of the glucose transporter 2 (GLUT2) in the adult rat brain—an immunohistochemical study. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 28(3), 117–136.

Arora, A. K. and Peterson, P. L. (1988). Functional significance of mitochondrial bound hexokinase in tumor cell metabolism. Evidence for preferential phosphorylation of glucose by intramitochondrially generated ATP+. *J. Biol. Chem.* 263,17422-17428.

Banka S. and Newman W. G (2013). A clinical and molecular review of ubiquitous glucose-6-phosphatase deficiency caused by G6PC3 mutations. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 8:84.

Benuck M, Stern F, Lajtha A (1972). Regional and subcellular distribution of aminotransferases in rat brain. *J Neurochem.* 19(4):949-57.

Benuck M, Lajtha A (1975). Aminotransferase activity in brain. *Int Rev Neurobiol.* 17:85-129.

Brekke E, Morken T. S., Sonnewald U. (2015). Glucose metabolism and astrocyte–neuron interactions in the neonatal brain. *InteARNtional*.

Brinschwitz, K., Dittgen, A., Madai, V. I., Lommel, R., Geisler, S., & Veh, R. W. (2010). Glutamatergic axons from the lateral habenula mainly terminate on GABAergic neurons of the ventral midbrain. *Neuroscience*, 168(2), 463–476.

Brophy, P. J., Boccaccio, G. L. & Colman, D. R. (1993) The distribution of myelin basic protein mRNAs within myelinating oligodendrocytes. *Trends in Neuroscience* 16, 515–521.



Bosio A., Binczek E., Stoffel W (1996). Functional breakdown of the lipid bilayer of the myelin membrane in central and peripheral nervous system by disrupted galactocerebroside synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:13280–13285.

Burchell A, Waddell ID (1991). The molecular basis of the hepatic microsomal glucosa-6-phosphatase system. *Biochem Biophys Acta*; 1092: 129-137.

Cano E. A., González H. D. (2011). F1 F0-ATP sintasa y sus diferencias estructurales. *REB* 30(3): 98-108.

Cañas, A. J., Hill, G., Carff, R., Suri, N., Lott, J., Gómez, G., Carvajal, R. (2004). CmapTools: A knowledge modeling and sharing environment. 125-135.

Carandini T, Mancini M, Bogdan I, Rae CL, Barritt AW, Sethi A, Harrison N, Rashid W, Scarpini E, Galimberti D, Bozzali M, Cercignani M (2021). Disruption of brainstem monoaminergic fibre tracts in multiple sclerosis as a putative mechanism for cognitive fatigue: a fixel-based analysis. *Neuroimage Clin.* 30:102587.

Carson, J. H., Worboys, K., Ainger, K., Barbarese, E. (1997) Translocation of myelin basic protein mRNA in oligodendrocytes requires microtubules and kinesin. *Cell Motility & the Cytoskeleton* 38, 318–328.

Coelho, A. I., Berry, G. T., & Rubio-Gozalbo, M. E. (2015). Galactose metabolism and health. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 18(4), 422–427.

Coetzee T., Fujita N., Dupree J., Shi R., Blight A., Suzuki K., Suzuki K., Popko B (1996). Myelination in the absence of galactocerebroside and sulfatide: Normal structure with abnormal function and regional instability. *Cell.* 86:209–219.

Cortés Mdel C, Gavito B, Ita ML, Valencia J, Eguibar JR (2005). Characterization of the spontaneous and gripping-induced immobility episodes on *taiep* rats. *Synapse.* 58(2):95-101.

Collinson, I. R., van Raaij, M. J., Runswick, M. J., Fearnley, I. M., Skehel, J. M., Orriss, G. L., Miroux B., Walker, J. E. (1994). ATP Synthase from Bovine Heart Mitochondria. *Journal of Molecular Biology*, 242(4), 408–421.



Connolly, D. J., Widjaja, E., & Griffiths, P. D. (2007). Involvement of the anterior lobe of the cerebellar vermis in perinatal profound hypoxia. *AJNR. American Journal of Neuroradiology*, 28, 16–19.

Cosin-Roger J, Vernia S, Alvarez MS, Cucarella C, Boscá L, Martin-Sanz P, Fernández-Alvarez AJ, Casado M (2013). Identification of a novel *Pfkfb1* mRNA variant in rat fetal liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 1;431(1):36-40.

Couve E., Cabello J. E., Krsulovic J., Rocangliolo M. (1997). Binding of Microtubules to Transitional Elements in Oligodendrocytes of the Myelin Mutant *taiep* Rat. Wiley-Liss, Inc. *JouARNI of Neuroscience Research* 47:573–581.

Cramer, P. (2019). Organization and regulation of gene transcription. *Nature*, 573(7772), 45-54.

Curtis, R. K., Orešič, M., & Vidal-Puig, A. (2005). Pathways to the analysis of microarray data. *Trends in Biotechnology*, 23(8), 429–435.

Dade M, Berzero G, Izquierdo C, Giry M, Benazra M, Delattre JY, Psimaras D, Alentorn A (2020). Neurological Syndromes Associated with Anti-GAD Antibodies. *Int J Mol Sci.* 24;21(10):3701.

Daif, A.; Lukas, R.V.; Issa, N.P.; Javed, A.; VanHaerents, S.; Reder, A.T.; Tao, J.X.; Warnke, P.; Rose, S.; Towle, V.L.; et al (2018). Antiglutamic acid decarboxylase 65 (GAD65) antibody-associated epilepsy. *Epilepsy Behav.* 80, 331–336.

Delgado-García J M. (2001). Structure and function of the cerebellum. *REV NEUROL.* 33: 635-42

Diario Oficial. (2001). Norma Oficial Mexicana-NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Dicko A, Heng YM, Boggs JM (2003). Interactions between glucosylceramide and galactosylceramide I(3) sulfate and microstructures formed. *Biochim Biophys Acta.* (1-2):87-100.



Dienel G. A. (2019). Brain Glucose Metabolism: Integration of Energetics with Function. *Physiol Rev* 99: 949 –1045.

DiNuzzo, M. & Schousbose, A. (2019). Brain glycogen metabolism. Copenhagen, Denmark. Springer. *Physiol Rev* 99: 949 –1045

Duncan ID, Bugiani M, Radcliff AB, Moran JJ, Lopez-Anido C, Duong P, August BK, Wolf NI, van der Knaap MS, Svaren J (2017). A mutation in the *Tubb4a* gene leads to microtubule accumulation with hypomyelination and demyelination. *Ann Neurol*. 81(5):690-702.

Duncan I. D., Lunn K. F., Holmgren B., Urba-Holmgren R., Brignolo-Holmes L. (1992). The *taiep* rat: a myelin mutant with an associated oligodendrocyte microtubular defect. Chapman and Hall Ltd. *JouARNI of Neurocytology* 21, 870-884.

Eguibar, J.R., Del Carmen Cortes, M., Lara-Lozano, M., Mendiola, D.M., (2012). Dopaminergic D2-like agonists produce yawning in the myelin mutant *taiep* and Sprague–Dawley rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 102, 118–123.

Engelen-Lee J, Blokhuis A M, Spliet W G M, Pasterkamp R J, Aronica E, Demmers J A A, Broekhuizen R, Nardo G, Bovenschen N, Van Den Berg L H. (2016). Proteomic profiling of the spinal cord in ALS: decreased ATP5D levels suggest synaptic dysfunction in ALS pathogenesis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, 18:3-4, 210-220.

Fabregat A., Sidiropoulos K., Garapati P., Gillespie M., Hausmann K., Haw R., Jassal B., Jupe S., Korninger F., McKay S., Matthews L., May B., Milacic M., Rothfels K., Shamovsky V., Webber M., Weiser J., Williams M., Wu G., Stein L., Hermjakob H., D'eustachio P. (2015). The Reactome pathway Knowledgebase. *Nucleic Acids Research*, 2016, Vol. 44, Database issue D481–D487.

Fernández-Gil, M. Á., Palacios-Bote, R., Leo-Barahona, M., Mora-Encinas, J. P. (2010). Anatomy of the Brainstem: A Gaze Into the Stem of Life. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*, 31(3), 196–219



Ferreira, G. C., Karimi, A. J., Waddell, J., & McKenna, M. C. (2021). Metabolism of [1,6- ¹³C]glucose in the cerebellum of 18-day-old rats: Comparison with cerebral metabolism. *Journal of Neurochemistry*, 157(6), 1946–1962.

Finnsson J, Lubberink M, Savitcheva I, Fällmar D, Melberg A, Kumlien E, Raininko R (2019). Glucose metabolism in the brain in LMNB1-related autosomal dominant leukodystrophy. *Acta Neurol Scand.*;139(2):135-142.

Francis A, Rivett AJ, Roth JA (1983). Activity of neuron-specific enolase in normal and lesioned rat brain. *Brain Res.* 14;263(1):89-95.

Froissart, R., Piraud, M., Boudjemline, A.M. Vianey-Saban C., Petit F., Hubert-Buron A., Eberschweiler P. T., Gajdos V., Labrune P (2011). Glucose-6-phosphatase deficiency. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 6, 27.

Funari VA, Herrera VL, Freeman D, Tolan DR (2005). Genes required for fructose metabolism are expressed in Purkinje cells in the cerebellum. *Brain Res Mol Brain Res.* 14;142(2):115-22.

Fuenzalida M, Aliaga E, Olivares V, Roncagliolo M, Bonansco C (2009). Developmental increase of asynchronous glutamate release from hippocampal synapses in mutant *taiep* rat. *Synapse.* 63(6):502-9.

Kalwy, S. A. & Smith, R. (1994) Mechanisms of myelin basic protein and proteolipid protein targeting in oligodendrocytes (review). *Molecular Membrane Biology* 11, 67–78.

Kanehisa, M., Araki, M., Goto, S., Hattori, M., Hirakawa, M., Itoh, M., Yamanishi, Y. (2007). KEGG for linking genomes to life and the environment. *Nucleic acids research*, 36, D480-D484.

Koepsell H (2020). Glucose transporters in brain in health and disease. *Pflugers Arch.* 472(9):1299-1343. doi: 10.1007/s00424-020-02441-x. Epub 2020 Aug 13.

Ghez C, Thach WT (2000). The cerebellum. In Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, eds. *Principles of neural science*. New York: Elsevier; 832-54.



Gibson RA, Lim JA, Choi SJ, Flores L, Clinton L, Bali D, Young S, Asokan A, Sun B, Kishnani PS (2021). Characterization of liver GSD IX γ 2 pathophysiology in a novel Phkg2^{-/-} mouse model. *Mol Genet Metab.* 133(3):269-276.

Gostomska-Pampuch K, Drulis-Fajdasz D, Gizak A, Wiśniewski JR, Rakus D (2021). Absolute Proteome Analysis of Hippocampus, Cortex and Cerebellum in Aged and Young Mice Reveals Changes in Energy Metabolism. *Int J Mol Sci.* 8;22(12):6188

Guyton, A. C. & Hall, E. J. (2011). *Tratado de fisiología médica de Guyton*. Barcelona, España: Elsevier.

Hegde P, Qi R, Abernathy K, Gay C, Dharap S, Gaspard R, Hughes JE, Snesrud E, Lee N, Quackenbush J (2000). A concise guide to cDNA microarray analysis. *Biotechniques.* 29(3):548-50, 552-4, 556 passim.

Heller M. J. (2002). DNA Microarray Technology: Devices, Systems, and Applications. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2002.4:129-153.

Hirai H (2017). [Production of the neuron-specific enolase in astrocytes, but not in neurons, under the neuronal inflammation]. *Seikagaku.* 89(2):241-3. Japanese.

Hitosugi T., Kang S., Vander Heiden M. G. et al. (2009) Tyrosine phosphorylation inhibits PKM2 to promote the Warburg effect and tumor growth. *Sci. Signal.*, 2, ra73

Ho, J.A., Chang, H.C., Shih, N.Y., Wu, L.C., Chang, Y.F., Chen, C.C., Chou, C. (2010). Diagnostic detection of human lung cancer-associated antigen using a gold nanoparticle-based electrochemical immunosensor. *Anal Chem.* 82, 5944-5950.

Hobert, O. (2008). Gene Regulation by Transcription Factors and MicroRNAs. *Science*, 319(5871), 1785–1786.

Holden, H. M., Rayment, I., & Thoden, J. B. (2003). Structure and function of enzymes of the Leloir pathway for galactose metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 278(45), 43885-43888.



Holgreth B. Urbá R., Riboni, L., Vega, E., (1989). *Sprague Dawley Rat Mutant with Tremor, Ataxia, Tonic Immobility Episodes, Epilepsy, and Paralysis*. Laboratory Animal Science. American Association for Laboratory Animal Science. Vol 39, No 3.

Howarth, C., Peppiatt-Wildman, C. M., & Attwell, D. (2010). The energy use associated with neural computation in the cerebellum. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 30, 403–414.

Hu TM, Chung HS, Ping LY, Hsu SH, Tsai HY, Chen SJ, Cheng MC (2020). Differential Expression of Multiple Disease-Related Protein Groups Induced by Valproic Acid in Human SH-SY5Y Neuroblastoma Cells. *Brain Sci.* 12;10(8):545.

Hughes SD, Quaade C, Johnson JH, Ferber S, Newgard CB (1993). Transfection of AtT-20ins cells with GLUT-2 but not GLUT-1 confers glucose-stimulated insulin secretion. Relationship to glucose metabolism. *J Biol Chem.* 15;268(20):15205-12.

Ishibashi T, Dupree JL, Ikenaka K, Hirahara Y, Honke K, Peles E, et al (2002). A myelin galactolipid, sulfatide, is essential for maintenance of ion channels on myelinated axon but not essential for initial cluster formation. *J Neurosci* (15):6507–14.

Jassal B, Matthews L, Viteri G, Gong C, Lorente P, Fabregat A, Sidiropoulos K, Cook J, Gillespie M, Haw R, Loney F, May B, Milacic M, Rothfels K, Sevilla C, Shamovsky V, Shorser S, Varusai T, Weiser J, Wu G, Stein L, Hermjakob H, D'Eustachio P (2020). The reactome pathway knowledgebase. *Nucleic acids research.* 48(D1) D498-D503.

Jin, H.; Wu, H.; Osterhaus, G.; Wei, J.; Davis, K.; Sha, D.; Floor, E.; Hsu, C.-C.; Kopke, R.D.; Wu, J.-Y (2003). Demonstration of functional coupling between gamma - aminobutyric acid (GABA) synthesis and vesicular GABA transport into synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 4293–4298.

Jouanne, M., Rault, S., Voisin-Chiret, A.S. (2017). Tau protein aggregation in Alzheimer's disease: An attractive target for the development of novel therapeutic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 139, 153–167.



Kalwy, S. A., Smith, R. (1994) Mechanisms of myelin basic protein and proteolipid protein targeting in oligodendrocytes (review). *Molecular Membrane Biology* 11, 67–78.

Langley OK, Ghandour MS (1981). An immunocytochemical investigation of non-neuronal enolase in cerebellum: a new astrocyte marker. *Histochem J.*13(1):137-48.

Lee YH, Li Y, Uyeda K, Hasemann CA (2003). Tissue-specific structure/function differentiation of the liver isoform of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *J Biol Chem.* 3;278(1):523-30.

Lebea, P. J., & Pretorius, P. J. (2005). The molecular relationship between deficient UDP-galactose uridyl transferase (GALT) and ceramide galactosyltransferase (CGT) enzyme function: A possible cause for poor long-term prognosis in classic galactosemia. *Medical Hypotheses*, 65(6), 1051–1057.

León Chávez. B. A., Guevara J., Galindo S., Luna J., Ugarte A., Villegas O., Mena R., Eguibar J. R., Martínez F. D. (2001). Regional and temporal progression of reactive astrogliosis in the brain of the myelin mutant *taiep* rat. Elsevier. *Brain Research* 900, 152–155

León Chávez. B. A., González B. J. A., Ugarte A., Meraz M. A., Martínez F. D. (2003). Evidence in vitro of glial cell priming in the *taiep* rat. Elsevier. *Brain Research* 965, 274–278.

Leturque A, Brot-Laroche E, Le Gall M (2009). GLUT2 mutations, translocation, and receptor function in diet sugar managing. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*;296(5):E985-92.

Li C, Huang L, Tian L, Chen J, Li S, Yang Z (2018). PHKG2 mutation spectrum in glycogen storage disease type IXc: a case report and review of the literature. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 28;31(3):331-338.

Li Y, Lu B, Sheng L, Zhu Z, Sun H, Zhou Y, Yang Y, Xue D, Chen W, Tian X, Du Y, Yan M, Zhu W, Xing F, Li K, Lin S, Qiu P, Su X, Huang Y, Yan G, Yin W (2018). Hexokinase 2-dependent hyperglycolysis driving microglial activation contributes to ischemic brain injury. *J Neurochem.* 144(2):186-200.



Loniewska MM, Gupta A, Bhatia S, MacKay-Clackett I, Jia Z, Wells PG (2020). DNA damage and synaptic and behavioural disorders in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient mice. *Redox Biol.*28:101332.

Lunn KF, Fanarraga ML, Duncan ID (1995): Myelin mutants: New models and new observations. *Microsc Res Tech* 32:183–203.

Lunn, K. F., Clayton, M. K. & Duncan, I. D (1997). The temporal progression of the myelination defect in the *taiep* rat. *JouARNI of Neurocytology* 26, 267–281.

MacDonnell PC, Greengard O (1974). Enzymes in intracellular organelles of adult and developing rat brain. *Arch Biochem Biophys.* 163(2):644-55.

Maier O., Hoekstra D., Baron W (2008). Polarity development in oligodendrocytes: Sorting and trafficking of myelin components. *J. Mol. Neurosci.* 35:35–53.

Maier T, Güell M, Serrano L (2009). Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett.* 2009 Dec 17;583(24):3966-73.

Manto M, Bower JM, Conforto AB, Delgado-García JM, da Guarda SN, Gerwig M, Habas C, Hagura N, Ivry RB, Mariën P, Molinari M, Naito E, Nowak DA, Oulad Ben Taib N, Pelisson D, Tesche CD, Tilikete C, Timmann D (2012). Consensus paper: roles of the cerebellum in motor control--the diversity of ideas on cerebellar involvement in movement. *Cerebellum.* 11(2):457-87.

Marandel L, Panserat S, Plagnes-Juan E, Arbenoits E, Soengas JL, Bobe J (2017). Evolutionary history of glucose-6-phosphatase encoding genes in vertebrate lineages: towards a better understanding of the functions of multiple duplicates. *BMC Genomics.* 2;18(1):342.

Marangos PJ, Schmechel DE, Parma AM, Goodwin FK (1980). Developmental profile of neuron-specific (NSE) and non-neuronal (NNE) enolase. *Brain Res.* 19;190(1):185-93.

Marquardt T, Bzduch V, Hoglebe M, Rust S, Reunert J, Grüneberg M, Park J, Callewaert N, Lachmann R, Wada Y, Engel T (2020). SLC37A4-CDG: Mislocalization



of the glucose-6-phosphate transporter to the Golgi causes a new congenital disorder of glycosylation. *Mol Genet Metab Rep.* 21;25:100636.

Mathews K.C., van Holde E. K., Aher G. K. (2004) *Bioquímica* 3th Edición. Pearson Addison Wesley, España.

Matsui T (2021). Exhaustive endurance exercise activates brain glycogen breakdown and lactate production more than insulin-induced hypoglycemia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 1;320(4):R500-R507.

Mejías R, Villadiego J, Pintado CO, Vime PJ, Gao L, Toledo-Aral JJ, Echevarría M, López-Barneo J (2006). Neuroprotection by transgenic expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase in dopaminergic nigrostriatal neurons of mice. *J Neurosci.* 26;26(17):4500-8.

Melø, T. M., Sonnewald, U., Bastholm, I. A., Nehlig, A. (2007). Astrocytes may play a role in the etiology of absence epilepsy: A comparison between immature GAERS not yet expressing seizures and adults. *Neurobiology of Disease*, 28(2), 227–235.

Minchenko O, Opentanova I, Caro J (2003). Hypoxic regulation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene family (PFKFB-1-4) expression in vivo. *FEBS Lett.* 20;554(3):264-70.

Möller J. R., Durr P. G., Quarles R. H., Duncan I. D. (1997). *Biochemical Analysis of Myelin Proteins in a Novel Neurological Mutant: The Taiep Rat.* *JouARNI of Neurochemistry.* Lippincott—Raven Publishers, Philadelphia. *InteARNtional Society for Neurochemistry.* 773—779.

Mohebiany AN, Schneider R (2013). Glutamate excitotoxicity in the cerebellum mediated by IL-1 β . *J Neurosci.* 20;33(47):18353-5.

Muller, F.L., Colla, S., Aquilanti, E., Manzo, V.E., Genovese, G., Lee, J., Eisenson, D., Narurkar, R., Deng, P., and Nezi, L. (2012). Passenger deletions generate therapeutic vulnerabilities in cancer. *Nature.* 488, 337-342.

Nelson SR, Schulz DW, Passonneau JV, Lowry OH (1968). Control of glycogen levels in brain. *J Neurochem.* 15(11):1271-9.



Nelson, L. D. & Cox, M. M., (2009). Lehninger. *Principios de Bioquímica*. Quinta edición. Barcelona, España.: Ediciones Omega .

Pacheco, G. A. B., Pérez, H., & Vizzi, E. (2015). Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa: características bioquímicas y moleculares. Prevalencia de la deficiencia. Archivos de Medicina (Manizales), 15(1), 138-150.

Patra K. C., Wang Q., Bhaskar P. T. et al. (2013) Hexokinase 2 is required for tumor initiation and maintenance and its systemic deletion is therapeutic in mouse models of cancer. *Cancer Cell* 24, 213– 228.

Peng L, Zhang X, Hertz L (1994). High extracellular potassium concentrations stimulate oxidative metabolism in a glutamatergic neuronal culture and glycolysis in cultured astrocytes but have no stimulatory effect in a GABAergic neuronal culture. *Brain Res.* 7;663(1):168-72.

Platt, D. C., Kamaljit Braich, J. R., McLauchlan, C. C., Jones M. A. (2021). 2'-3'-Cyclic Nucleotide 3'-Phosphodiesterase Inhibition by Organometallic Vanadium Complexes: A Potential New Paradigm for Studying CNS Degeneration. *Brain Sci.* 2021, 11, 588.

Pei L, Wallace DC (2018). Mitochondrial Etiology of Neuropsychiatric Disorders. *Biol Psychiatry.* 1;83(9):722-730.

Pénicaud L, Leloup C, Lorsignol A, Alquier T, Guillod E (2002). Brain glucose sensing mechanism and glucose homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 5(5):539-43.

Peshavaria, M. and Day, I.N. (1991). Molecular structure of the human muscle-specific enolase gene (ENO3). *Biochem J.* 275, 427-433.

Poitelon Y, Kopec AM, Belin S (2020). Myelin Fat Facts: An Overview of Lipids and Fatty Acid Metabolism. *Cells.* 27;9(4):812.

Psarra, A.-M. G., Pfeiffer, B., Giannakopoulou, M., Sotiroudis, T. G., Stylianopoulou, F., Hamprecht, B. (1998). Immunocytochemical localization of glycogen phosphorylase



kinase in rat brain sections and in glial and neuronal primary cultures. *Journal of Neurocytology*, 27(11), 779–790.

Ramírez, S. J., Chávez, G. L., Santillán T. J. L. y Guzmán. L. S. (2004). *Microarreglos de ADN: fabricación, proceso y análisis*. Unidad de Microarreglos de DNA, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México.

Ricaurte-Fajardo A, Zarco LA. (2020). Clinical presentation of the spectrum of myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody disease. *Rev Neurol*. 71 (07):257-269

Rigalli, A. (2016). Enzimas de glucólisis y gluconeogénesis. Un enfoque detallado.

Takayasu, Y., Iino, M., Shimamoto, K., Tanaka, K., & Ozawa, S. (2006). Glial glutamate transporters maintain one-to-one relationship at the climbing fiber-Purkinje cell synapse by preventing glutamate spillover. *Journal of Neuroscience*, 26, 6563–6572.

Takayasu, Y., Iino, M., Takatsuru, Y., Tanaka, K., & Ozawa, S. (2009). Functions of glutamate transporters in cerebellar Purkinje cell synapses. *Acta Psychologica*, 197, 1–12.

Tan VP, Miyamoto S (2015). HK2/hexokinase-II integrates glycolysis and autophagy to confer cellular protection. *Autophagy*.11(6):963-4.

Tepavcević, V. (2021). Oligodendroglial Energy Metabolism and (re)Myelination. *Life*, 11, 238.

Thorens B (2001). GLUT2 in pancreatic and extra-pancreatic gluco-detection (review). *Mol Membr Biol*.18(4):265-73.

Thorens, B. (2015). GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis. *Diabetologia*, 58(2), 221–232.

Saadat L., Dupree J.L., Kilkus J., Han X., Traka M., Proia R.L., Dawson G., Popko B (2010). Absence of oligodendroglial glucosylceramide synthesis does not result in CNS myelin abnormalities or alter the dysmyelinating phenotype of CGT-deficient mice. *Glia*. 58:391–398.



Sakagishi Y (1995). Alanina aminotransferasa (ALT). *Nihon Rinsho.*; 53(5):1146-50. Japonés. PMID: 7602770.

Sánchez-Campusano R, Gruart A, Delgado-García JM (2009). Dynamic associations in the cerebellar-motoneuron network during motor learning. *J Neurosci.* 26;29(34):10750-63.

Sandoval-Muñiz R. J., Vargas-Guerrero B., Flores-Alvarado L. J., Gurrola-Díaz C. M. (2007). Glucotransportadores (GLUT): Aspectos clínicos, moleculares y genéticos. *Gac Med Mex.* 152:547-57.

Schmitt S., Castelvetti L.C., Simons M (2015). Metabolism and functions of lipids in myelin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1851:999–1005.

Shyh-Chang N, Daley GQ, Cantley LC (2013). Stem cell metabolism in tissue development and aging. *Development.* 140(12):2535-47.

Solimena M, Aggujaro D, Muntzel C, Dirkx R, Butler M, De Camilli P, Hayday A (1993). Association of GAD-65, but not of GAD-67, with the Golgi complex of transfected Chinese hamster ovary cells mediated by the N-terminal region. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1;90(7):3073-7.

Son, Y.-D., Cho, Z.-H., Kim, H.-K., Choi, E.-J., Lee, S.-Y., Chi, J.-G., ... Kim, Y.-B. (2012). Glucose metabolism of the midline nuclei raphe in the brainstem observed by PET–MRI fusion imaging. *NeuroImage*, 59(2), 1094–1097.

Song J., O’conor L. T., Yu W., Bass., Duncan I. D. (1999). Microtubule alterations in cultured *taiep* rat oligodendrocytes lead to deficits in myelin membrane formation. *JouARNI of Neurocytology* 28, 671–683.

Soto-Rodriguez G, Gonzalez-Barrios JA, Martinez-Fong D, Blanco-Alvarez VM, Eguibar JR, Ugarte A, Martinez-Perez F, Brambila E, Peña LM, Pazos-Salazar NG, Torres-Soto M, Garcia-Robles G, Tomas-Sanchez C, Leon-Chavez BA (2015). Analysis of chemokines and receptors expression profile in the myelin mutant *taiep* rat. *Oxid Med Cell Longev.* 2015:397310.



Soto-Rodríguez, G. , Martínez-Fong, D. , Arroyo, R. , Aguilar-Alonso, P. , Rubio, H., Eguibar, J. , Ugarte, A. , Torres-Soto, M. , González-Barríos, J., Cebada, J., Brambila, E. y León-Chávez, B. (2012). La producción de óxido nítrico se asocia a un aumento de la lipoperoxidación y caspasa- 3 activa en regiones cerebrales desmielinizadas de la rata *taiep*. *Avances en Biociencia y Biotecnología*, 3,695-704.

Stephens, H. R., & Sandborn, E. B. (1976). Cytochemical localization of glucose-6-phosphatase activity in the central nervous system of the rat. *Brain Research*, 113(1), 127–146.

Stincone A, Prigione A, Cramer T, Wamelink MM, Campbell K, Cheung E, Olin-Sandoval V, Grüning NM, Krüger A, Tauqeer Alam M, Keller MA, Breitenbach M, Brindle KM, Rabinowitz JD, Ralser M (2015). The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 90(3):927-63.

Stryer L., Berg M. J., Tymoczko L. J. (2002) *Bioquímica* 5th Edición. Reverté, S. A. Barcelona, España.

Tan KN, McDonald TS, Borges K (2015) Metabolic dysfunctions in epilepsy and novel metabolic treatment approaches. In: *Bioactive Nutraceuticals and Dietary Supplements in Neurological and Brain Disease*, R.R. Watson, V. Preedy, eds. Elsevier, New York, 461–473.

Trapp, B. D., Andrews, S. B., Cootauco, C., Quarles, R. (1989). The myelin-associated glycoprotein is enriched in multivesicular bodies and periaxonal membranes of actively myelinating oligodendrocytes. *JouARNI of Cell Biology* 109, 2417–2426.

Van Karnebeek, C. D. M., Ramos, R. J., Wen, X.-Y., Tarailo-Graovac, M., Gleeson, J. G., Skrypnik, C., Wevers, R. A. (2019). Bi-allelic GOT2 Mutations Cause a Treatable Malate-Aspartate Shuttle-Related Encephalopathy. *The American Journal of Human Genetics*.

van Schaftingen E, Gerin I (2002). The glucose-6-phosphatase system. *Biochem J*. 15;362(Pt 3):513-32.



Vander Kooi BT, Onuma H., Oeser J. K., Svictek C., Allen S. R., Vander Kooi C. V., Chazin W., O'Brien R (2005). The glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene promoter contains both positive and negative glucocorticoid response elements. *Mol Endocrinol* 19:3001–3022

Vantourout P, Radojkovic C, Lichtenstein L, Pons V, Champagne E, Martinez LO (2010). Ecto-F₁-ATPase: un complejo proteico a la luz de la luna y un receptor inesperado de apoA-I. *Mundo J Gastroenterol.* 21;16(47):5925-35.

Vannucci S.J. (1994). Developmental expression of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in rat brain. *J Neurochem.* Jan;62.

Vedavathi, M., Girish, K. S., & Kumar, M. K. (2004). Isolation and characterization of cytosolic alanine aminotransferase isoforms from starved rat liver. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 267(1/2), 13–23.

Verdino A, D'Urso G, Tammone C, Scafuri B, Marabotti A (2021). Analysis of the Structure-Function-Dynamics Relationships of GALT Enzyme and of Its Pathogenic Mutant p.Q188R: A Molecular Dynamics Simulation Study in Different Experimental Conditions. *Molecules.* 30;26(19):5941.

Voet D., Voet G. J. (1995) *Biochemistry*. 2th Edición. John Willy & Sons, INC. E.U.

Vogel C, Marcotte EM (2012). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet.* 13;13(4):227-32.

Waheed, N., Saeed, A., Ijaz, S., Fayyaz, Z., Anjum, M. N., Zahoor, Y., & Cheema, H. A. (2020). Variability of clinical and biochemical phenotype in liver phosphorylase kinase deficiency with variants in the phosphorylase kinase (PHKG2) gene. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 33(9), 1117–1123.

Warburg, O. H. and Walter, C. (1932). Über dein neues Oxydationsferment und ein Absorptionsspektrum . Berlin: Verlag von Julius Springer. Print.

Welsh, J. P., Yuen, G., Placantonakis, D. G., Vu, T. Q., Haiss, F., O'hearn, E., Molliver, M. E., & Aicher, S. A. (2002). Why do Purkinje cells die so easily after global



brain ischemia? Aldolase C, EAAT4, and the cerebellar contribution to posthypoxic myoclonus. *Advances in Neurology*, 89, 331–359

Wilson, R., Brophy, P. J. (1989) Role for the oligodendrocyte cytoskeleton in myelination. *JouARNI of Neuroscience Research* 22, 439–448.

Yang H, Zhou L, Shi Q, Zhao Y, Lin H, Zhang M, Zhao S, Yang Y, Ling ZQ, Guan KL, Xiong Y, Ye D (2015). SIRT3-dependent GOT2 acetylation status affects the malate-aspartate NADH shuttle activity and pancreatic tumor growth. *EMBO J.* 15;34(8):1110-25.

Yu AS, Hirayama BA, Timbol G, Liu J, Diez-Sampedro A, Kepe V, Satyamurthy N, Huang SC, Wright EM, Barrio JR (2013). Regional distribution of SGLT activity in rat brain in vivo. *Am J Physiol Cell Physiol*.

Zheng X, Boyer L, Jin M, Mertens J, Kim Y, Ma L, Ma L, Hamm M, Gage F H. (2016). Metabolic reprogramming during neuronal differentiation from aerobic glycolysis to neuronal oxidative phosphorylation. *eLife*; 5:e13374.