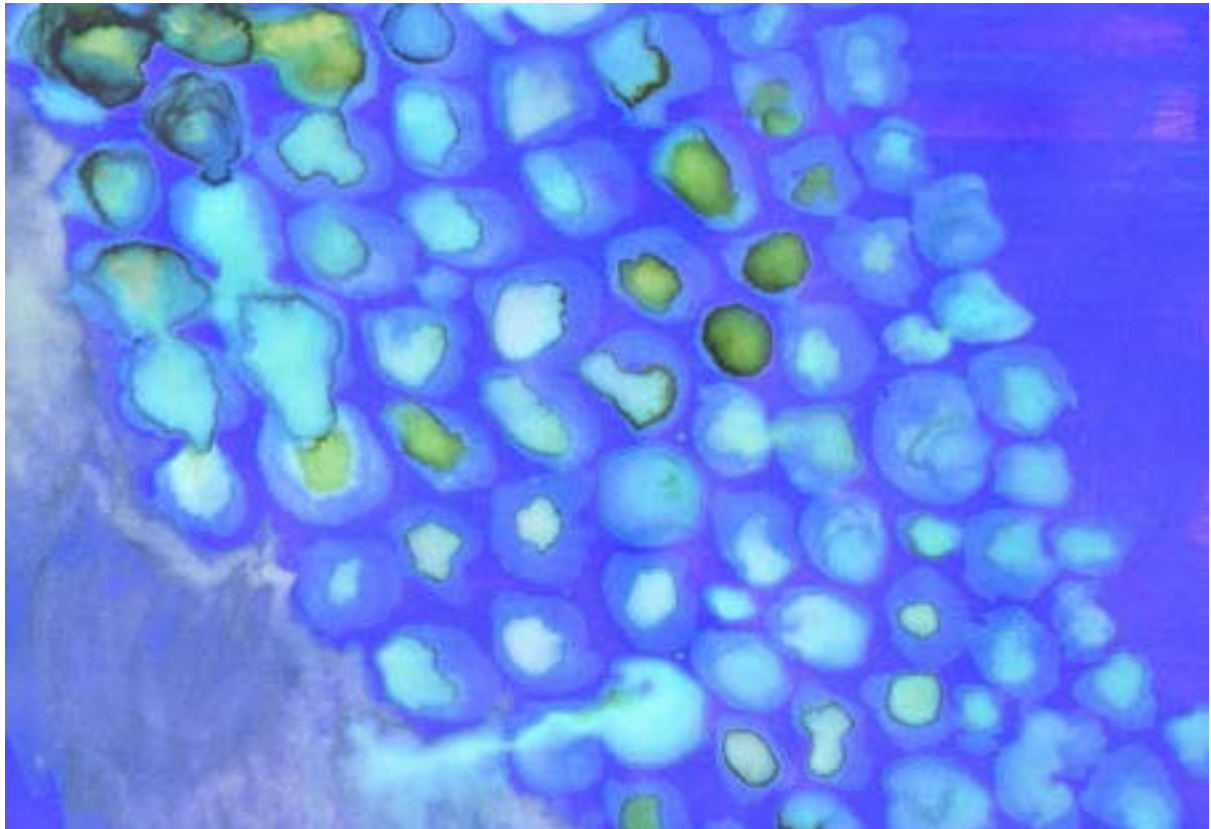

TESI DOCTORAL

ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA EN ELS GANGLIS DE LES ARRELS DORSALS DEL NERVI CIÀTIC EN EL RATOLÍ TRANSGÈNIC RIP/INF β , MODEL DE NEUROPATIA DIABÈTICA

Laia Foradada Felip

Departament de Medicina i Cirurgia Animals
Universitat Autònoma de Barcelona, 2013



**ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA EN ELS
GANGLIS DE LES ARRELS DORSALS DEL NERVI
CIÀTIC EN EL RATOLÍ TRANSGÈNIC RIP/INF β ,
MODEL DE NEUROPATIA DIABÈTICA**

Memòria presentada per Laia Foradada Felip per optar
al grau de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona

Programa de Doctorat en Medicina i Sanitat Animals

Bellaterra, 27 de Setembre de 2013



Tesi Doctoral dirigida per:

Dolors Fondevila i Palau
Rosa M^a Rabanal Prados

DOLORS FONDEVILA I PALAU, Catedràtica d'Universitat del Departament de Medicina i Cirurgia Animals de la Universitat Autònoma de Barcelona

i

ROSA M^a RABANAL PRADOS, Titular d'Universitat del Departament de Medicina i Cirurgia Animals de la Universitat Autònoma de Barcelona

FAN CONSTAR

Que la memòria titulada “Anàlisi de l'expressió gènica en els ganglis de les arrels dorsals del nervi ciàtic en el ratolí transgènic RIP/INF β , model de neuropatia diabètica” presentada per Laia Foradada Felip per a optar al Títol de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona, s'ha realitzat sota la nostra direcció, i, en considerar-la conclosa, autoritzem la seva presentació per a ser jutjada pel tribunal corresponent.

I per tal que consti als efectes que s'escaigui, signem la present a Bellaterra, el 27 de Juliol de 2013.

Dra. Dolors Fondevila i Palau

Dra. Rosa M^a Rabanal Prados

Als meus pares,
a l'Enric i l'Ester,
i al Marc.

AGRAIMENTS

En primer lloc, vull agrair tota la feina feta a les meves directores, la Rosa i la Dolors. A la Dolors perquè gràcies a ella vaig començar la carrera investigadora i perquè és la dona més forta que conec. A la Rosa, dir sempre que sí, pel seu cinisme i el bon humor. I al Peio, “por derecho conyugal”, i per ser la persona que sempre ha cregut en aquesta tesi i en els seus resultats.

Al Martí per les lliçons de neuropatologia i a l'Anna per haver començat amb aquest estudi, sense ella no hi ha principi i no hi ha final. A tota la gent del grup de Neuropatologia i del servei d'Histologia i d'Anatomia Patològica amb qui vaig coincidir durant els anys de becaria: la Jessi, la Merce, la Lola, l'Anna Domènech, la Carme, el Jorge, l'Alberto, la Mar i la Mar. I sobretot, sobretot, sobretot a l'Enric i a l'Ester perquè, a part de la seva inestimable ajuda, he trobat dos grans amics, i gràcies a la seva companyia, bromes, tonteries, nits i concerts aquest ha estat un camí la mar d'agradable, i quan no ho era, al seu costat es tornava a ser-ho. I perquè sempre més hi haurà un buit a les deu del matí dels dies laborables, L'HORA DEL CAFÈ.

Al CBATEG, al Miquel, al Carles Roca i a la Ivette; a la Mariana i el David pel teatre. Al Chris Mann que és una barreja de Jesucrist i Superman, sense ell segur que aquesta tesi no hagués tirat endavant. Ell em va ensenyar que el món dels microarrays és un espai insuportablement fascinant i d'opcions irritablement infinites, sovint desesperant. Pels arxius anomenats “cerveza fría”, “vacaciones”, “69”... i perquè encara ens hem de prendre moltes cerveses plegats.

A tots els ratolins que han perdut la vida en aquest estudi.

A les Aquaporines.

Als gens sobrerregulats.

Als meus pares, perquè, altre vegada, tenien raó i, un cop escrita la tesi, sento una satisfacció majúscula. La seva insistència, sovint molesta, ha valgut la pena. Aquesta tesi els hi fa molta il·lusió i és per ells. Al Pol, ell no va opinar gaire sobre els estudis de doctorat, cosa que fa de bon de germà, i li agraeixo.

A l'Ari, la Belén, l'Ingride, la Mireia i la Carla, elles son "chuchuland", aquest territori del que mai vull marxar, elles són casa i sense elles aquesta vida no tindria cap gràcia, de debò. I a l'Eneida, per ser-ne el vestigi veterinari.

Al "Pappa Cigarro" i la Lúdia, a l'Esteban, a l'Anna Pfaff, al Marçal i al Jordi Vilches. A Mujeres per haver posat la banda sonora a gran part d'aquesta etapa de la meva vida i al Senyor Pol, per haver estat al meu costat, i tot i no haver entès res de la feina que faig, haver-me divertit tant i tant durant uns anys d'aquest estudi. I a la difunta Luchador Records.

A l'Alex i al Mario, pels pocs dies i el suport des de la distància, per creure incondicionalment en mi.

A Ansó, així en general, i als Fieles en concret; i al Molí, així en general, i als Molineros en concret. Tots ells han fet molt feliç la meva infància i adolescència, i m'han convertit en una millor persona.

A les noies de Functional Validation and Preclinical Research, per aguantar-me a hores d'ara i per haver-me ensenyat tant.

A Mahler, Migala i Jacques Loussier, a Twin Peaks i a l'Steven Spielberg, a LA FUERZA de Kokoshca, a Toxicosmos de Los Planetas.

Al Gasset i a l'Ari, el peix.

I finalment, al Marc, perquè ho ha fet tot bonic aquests últims dos anys. Perquè m'ha donat la vida i, a més a més, l'energia, que tenia gairebé esgotada, per acabar aquesta feina. Ell ha maquetat aquesta tesi i l'ha deixada preciosa, n'ha fet la portada, és el Déu dels dissenyadors gràfics. I perquè és màgia tenir-lo al costat cada dia i així seguirà sent per la resta dels nostres dies. T'estimo Senderitos. I gràcies.

ABREVIATURES

ADA	<i>American Diabetes Association</i>
AGEs	productes de glicosilació avançats
AGD	àcid glutàmic descarboxilasa
AR	aldosa reductasa
CBATEG	Centre de Biotecnologia i Teràpia Gènica
cDNA	DNA còpia
Ct	RT-qPCR <i>cycle threshold</i>
DAG	diacilglicerol
DAVID	<i>Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery</i>
DEPC	dietilpirocarbonat
DNA	àcid desoxiribonucleic
DM	diabetis mellitus
DS	desviació estàndard
F-actina	filaments d'actina
FC	<i>fold-change</i>
GAD	gangli de l'arrel dorsal
GLUT-2	transportador de la glucosa 2
GLUT-4	transportador de la glucosa 4
GO	<i>Gene Ontology</i>
ICR	animals controls ICR tractats amb vehicle
ICR-STZ	animals controls ICR tractats amb STZ
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
IGF-1	<i>insulin-like growth factor 1</i>
IGF-2	<i>insulin-like growth factor 2</i>
INF β	interferó β
IRHUVH	Institut de Recerca de l'Hospital Universitari de la Vall d'Hebron
MEC	matriu extracel·lular
NADPH	<i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
ND	neuropatia diabètica

NGF	<i>nerve growth factor</i>
NOD	ratolí obès no diabètic
PARP	poli-ADP-ribosa polimerasa
PKC	proteïna cinasa C
PND	polineuropatia diabètica
RAGE	receptors de productes de glicosilació avançats
RIP	promotor d'insulina de rata
RIP/INF β	gen quimèric promotor RIP - cDNA interferó β
RMA	<i>multi-array average</i>
RNA	àcid ribonucleic
ROS	espècies reactives d'oxigen
RT-qPCR	PCR quantitativa en temps real
SN	sistema nerviós
SNA	sistema nerviós autònom
SNC	sistema nerviós central
SNP	sistema nerviós perifèric
STZ	estreptozotocina
Tg	animals transgènics RIP/INF β tractats amb vehicle
Tg-STZ	animals transgènics (RIP/INF β) tractats amb STZ
VGF	<i>Nerve growth factor inducible</i>

LLISTAT DE GENS

36B4	<i>RT-qPCR housekeeping</i>
Accn1	<i>amiloride-sensitive cation channel 1, neuronal</i>
Adat2	<i>adenosine deaminase, tRNA-specific 2, TAD2 homolog</i>
Adcyap1	<i>adenylate cyclase activating polypeptide</i>
Angpt1	<i>angiopoietin 1</i>
Angptl2	<i>angiopoietin-like 2</i>
Atf3	<i>activating transcription factor 3</i>
Axl	<i>AXL receptor tyrosine kinase</i>
B3galt5	<i>UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 5</i>
Baiap2l1	<i>BAI1-associated protein 2-like 1</i>
Bdnf	<i>brain-derived growth factor</i>
Cacna2d1	<i>calcium channel, voltage-dependent, alpha2/delta subunit 1</i>
Calb1	<i>calbindin 1</i>
Car3	<i>Carbonic anhydrase 3</i>
Cckbr	<i>cholecystokinin B receptor</i>
Cdf	<i>catenin (cadherin associated protein), alpha 2</i>
Cd36	<i>CD36 antigen</i>
Col3a1	<i>collagen, type III, alpha 1</i>
Col5a2	<i>collagen, type V, alpha 2</i>
Col18a1	<i>collagen, type XVIII, alpha 1</i>
Comp	<i>cartilage oligomeric matrix protein</i>
Crh	<i>Corticotropin releasing hormone</i>
Ctsb	<i>cathepsin B</i>
Ctss	<i>cathepsin S</i>
Cxcl12	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 12</i>
Cx3cr1	<i>similar to chemokine receptor CX3CR1; chemokine (C-X3-C) receptor 1</i>
Cxcr4	<i>Chemokine (C-X-C motif) receptor 4</i>
Cybb	<i>cytochrome b-245, beta polypeptide</i>

Dbp	<i>D site albumin promoter binding protein</i>
Dtx4	<i>lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1 (Lyve), deltex 4 homolog</i>
Dynll2	<i>dynein light chain LC8-type 2</i>
E2f1	<i>E2F transcription factor 1</i>
Ecel1	<i>endothelin converting enzyme-like 1</i>
Eef1e1	<i>eukaryotic translation elongation factor 1 epsilon 1</i>
Elk3	<i>ELK3, member of ETS oncogene family</i>
Egr3	<i>early growth response 3</i>
Fabp4	<i>Fatty acid binding protein 4, adipocyte f</i>
Fars2	<i>Phenylalanine-tRNA synthetase 2</i>
Flrt3	<i>fibronectin leucine rich transmembrane protein 3</i>
Foxd1	<i>Forkhead box D1</i>
Gabrb3	<i>Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit beta 3</i>
Gal	<i>Galanin</i>
Galc	<i>galactosylceramidase</i>
Gdpd3	<i>glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 3</i>
Gja1	<i>gap junction protein, alpha 1</i>
Gpr151	<i>G protein-coupled receptor 151</i>
Hes5	<i>hairy and enhancer of split 5</i>
Hist2h3c2	<i>histone cluster 2, H3c2</i>
Hif1an	<i>hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit inhibitor</i>
Htr3a	<i>5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3A</i>
Ifi202b	<i>interferon activated gene 202B</i>
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
IGF-1	<i>insulin-like growth factor 1</i>
Igf1	<i>insulin-like growth factor 1</i>
Ighg	<i>Immunoglobulin heavy chain (gamma polypeptide)</i>
Il13ra1	<i>interleukin 13 receptor, alpha 1</i>
Kcna6	<i>potassium voltage-gated channel, shaker-related, subfamily, member 6</i>

Kcnj13	<i>potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 13</i>
Kcnmb1	<i>potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, beta member 1</i>
Kcnq5	<i>potassium voltage-gated channel, subfamily Q, member 5</i>
Kcns1	<i>K⁺ voltage-gated channel, subfamily S, 1</i>
Kcnt1	<i>potassium channel, subfamily T, member 1</i>
Kctd12	<i>potassium channel tetramerisation domain containing 12</i>
Lingo1	<i>leucine rich repeat and Ig domain containing 1</i>
Lmo7	<i>LIM domain only 7</i>
Loxl2	<i>lysyl oxidase-like 2</i>
Maff	<i>v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein F</i>
Mapk8	<i>mitogen-activated protein kinase 8</i>
Mark1	<i>MAP/microtubule affinity-regulating kinase 1</i>
Mbl2	<i>mannose-binding lectin (protein C) 2</i>
Metrn	<i>Meteorin, glial cell differentiation regulator</i>
Mlc1	<i>megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts 1 homolog (human)</i>
Mmp16	<i>matrix metalloproteinase 16</i>
Mrlpl35	<i>Mitochondrial ribosomal protein L35</i>
Neto1	<i>neuropilin (NRP) and tolloid (TLL)-like 1</i>
Nfatc2	<i>nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 2</i>
Nptx	<i>neuronal pentraxin</i>
Nptx1	<i>neuronal pentraxin 1</i>
Npy	<i>Neuropeptide Y</i>
Npy1r	<i>Neuropeptide Y receptor Y1</i>
Npy2r	<i>Neuropeptide Y receptor Y2</i>
Nrcam	<i>neuron-glia-CAM-related cell adhesion molecule</i>
Nts	<i>Neurotensin</i>

Orai1	<i>ORAI calcium release-activated calcium modulator 1</i>
Pappa	<i>pregnancy-associated plasma protein A</i>
Postn	<i>periostin, osteoblast specific factor</i>
Phb	<i>Prohibitin</i>
Ppp1r2	<i>predicted gene 5490; protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 2; predicted gene 2780; predicted gene 7749; predicted gene 2802; hypothetical protein</i>
Prmt8	<i>protein arginine N-methyltransferase 8</i>
Prss35	<i>Protease, serine, 35</i>
Ptprc	<i>protein tyrosine phosphatase, receptor type, C</i>
Ptprz1	<i>Protein tyrosine phosphatase, receptor type Z, polypeptide 1</i>
Psid	<i>phosphatidylserine decarboxylase</i>
Ptx3	<i>pentraxin related gene</i>
Rab37	<i>RAB37, member of RAS oncogene family</i>
Ranbp3l	<i>RAN binding protein 3-like</i>
Rlbp1	<i>retinaldehyde binding protein 1</i>
Rnasen	<i>ribonuclease III, nuclear</i>
Rgs2	<i>regulator of G-protein signaling 2</i>
Rgs18	<i>regulator of G-protein signaling 18</i>
Rassf10	<i>Ras association (RalGDS/AF-6) domain family (N-terminal) member 10</i>
Runx1t1	<i>runt-related transcription factor 1; translocated to, 1 (cyclin D-related)</i>
Selenbp1	<i>selenium binding protein 1; hypothetical protein LOC100044204</i>
Sema6a	<i>semaphorin 6A</i>
Serpina1b	<i>deserine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 1A</i>
Slc6a4	<i>solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4</i>
Slc6a6	<i>solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, taurine), member 6</i>

Slc6a19	<i>solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 19</i>
Slc15a3	<i>solute carrier family 15, member 3</i>
Slc15a2	<i>solute carrier family 15, member 2</i>
Slc39a6	<i>solute carrier family 39 (zinc transporter), member 6</i>
Snapin	<i>SNAP-associated protein</i>
Snx11	<i>sorting nexin 11</i>
Sox11	<i>SRY-box containing gene 11</i>
Sprr1a	<i>Small proline-rich</i>
Tgfb1	<i>Transforming growth factor, beta induced</i>
Tfnaip	<i>tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8</i>
Tnc	<i>Tensacin C</i>
Tnik	<i>TRAF2 and NCK interacting kinase</i>
Tnpo	<i>transportin 3</i>
Trf	<i>transferrin</i>
Trim16	<i>F-box and WD-40 domain protein 10; tripartite motif-containing 16</i>
Trpv1	<i>transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1</i>
Tshz2	<i>teashirt zinc finger family member 2</i>
Vgf	<i>Nerve growth factor inducible</i>
Vps13b	<i>vacuolar protein sorting 13B (yeast)</i>
Zic1	<i>similar to Zic protein; zinc finger protein of the cerebellum 1</i>

INDEX

I. RESUM/SUMMARY	25
II. INTRODUCCIÓ	37
1. El sistema nerviós	39
1.1. El sistema nerviós perifèric	39
1.1.1. El nervi perifèric	41
1.1.2. El gangli de l'arrel dorsal	46
1.1.3. El nervi ciàtic	48
1.2. Degeneració i regeneració del sistema nerviós perifèric	48
2. Diabetis mellitus	56
2.1. Tipus de diabetis mellitus	56
2.2. Epidemiologia	58
2.3. Simptomatologia i complicacions a llarg termini	58
2.4. La polineuropatia diabètica	59
2.4.1. Mecanismes implicats en la degeneració nerviosa en la polineuropatia diabètica	60
- La via del poliòl	
- Acumulació d'espècies reactives d'oxigen	
- Activació incorrecte de la PKC	
- L'auto-oxidació de la glucosa	
- Alteracions en els factors neurotròfics	
2.4.2. Lesions en la polineuropatia diabètica	66
2.4.3. Polineuropatia diabètica i regeneració nerviosa	67
3. Models animals per a l'estudi de la diabetis mellitus	69
3.1. Models animals de diabetis espontània	70
3.1.1. Models de diabetis espontània tipus I	70
3.1.2. Models de diabetis espontània tipus II	71
3.2. Models induïts per fàrmacs	73
3.3. Models mixtes transgènics que expressen $INF\beta$ a les cèl·lules pancreàtiques tractats amb STZ	74

4. Expressió gènica	76
4.1. Anàlisi massiu de l'expressió gènica	77
4.1.1. Els <i>microarrays</i> de cDNA	78
4.1.2. Els <i>microarrays</i> d'oligonucleòtids	78
4.2. Anàlisi de l'expressió gènica en neuropaties	79
III. OBJECTIUS	83
IV. MATERIAL I MÈTODES	89
1. Animals	91
1.1. Grups d'animals	92
1.2. Procediment experimental	93
1.2.1. Inducció de la diabetis experimental mitjançant STZ	94
1.2.2. Determinació del pes corporal dels animals i de la glucosa en sang	94
1.2.3. Lesió per aixafament del nervi ciàtic esquerre	95
1.3. Presa de mostres	96
2. Processament de les mostres	97
2.1. Extracció del RNA	97
2.2. Anàlisi de la qualitat del RNA	98
3. Anàlisi de l'expressió gènica: <i>microarrays</i>	99
3.1. Processament de les dades dels <i>microarrays</i>	99
3.2. Anàlisi de les dades dels <i>microarrays</i>	101
3.2.1. Valor del FC	101
3.2.2. Anàlisis comparatius	102
- I. Anàlisi comparatiu: ICR lesionades vs ICR no lesionades	
- II. Anàlisi comparatiu: Tg-STZ no lesionades vs ICR no lesionades	
- III. Anàlisi comparatiu: Tg-STZ lesionades vs ICR lesionades	
- IV. Anàlisi conjunt: Tg-STZ no lesionades i lesionades vs ICR no lesionades i lesionades	

3.2.3. <i>Heatmap clustering</i>	103
3.2.4. Anàlisi dels processos biològics	104
3.2.5. Anàlisi conjunt	104
4. Validació per PCR quantitativa en temps real	105
4.1. Transcripció inversa	105
V. RESULTATS	109
1. Avaluació de la diabetis mellitus i de la lesió per aixafament del nervi ciàtic	111
1.1. Avaluació de la diabetis mellitus	111
1.2. Avaluació de la lesió per aixafament del nervi ciàtic	113
2. Anàlisi de les dades obtingudes dels <i>microarrays</i>	114
2.1. Anàlisi de l'expressió gènica en tots els grups	115
2.2. Anàlisi de l'expressió gènica dels GAD de les extremitats dels animals Tg-STZ vs les extremitats dels animals ICR	118
3. I. Anàlisi comparatiu: ICR lesionades vs ICR no lesionades	120
4. II. Anàlisi comparatiu: Tg-STZ no lesionades vs ICR no lesionades	132
5. III. Anàlisi comparatiu: Tg-STZ lesionades vs ICR lesionades	150
6. IV. Anàlisi conjunt: Tg-STZ no lesionades i lesionades vs ICR no lesionades i lesionades	174
6.1. Gens coincidents: Tg-STZ no lesionades vs ICR no lesionades i Tg-STZ lesionades vs ICR lesionades	176
6.2. Gens que s'expressen únicament en Tg-STZ no lesionades vs ICR no lesionades	179
6.3. Gens que s'expressen únicament en Tg-STZ lesionades vs ICR lesionades	182

7. Processos biològics	185
7.1. Senyalització	
7.2. Desenvolupament del sistema nerviós	
7.3. Dolor neuropàtic	
7.4. Transmissió sinàptica	
7.5. Matriu extracel·lular	
7.6. Transport	
7.7. Apoptosi	
7.8. Resposta immune	
7.9. Metabolisme	
8. Sinopsi del perfil d'expressió gènica i dels processos biològics de cada condició experimental	192
9. Validació dels resultats dels <i>microarrays</i> mitjançant RT-qPCR	194
9.1. RT-qPCR dels GAD de les extremitats lesionades en els animals ICR	195
9.2. RT-qPCR dels GAD de les extremitats no lesionades dels animals Tg-STZ	196
9.3. RT-qPCR dels GAD de les extremitats lesionades dels animals Tg-STZ	197
VI. DISCUSSIÓ	201
- Senyalització	
- Desenvolupament del sistema nerviós	
- Dolor neuropàtic	
- Transmissió sinàptica	
- Matriu extracel·lular	
- Transport	
- Apoptosi	
- Resposta immune	
- Metabolisme	

VII. CONCLUSIONS

225

VIII. BIBLIOGRAFÍA

229

I. RESUM/SUMMARY

La polineuropatia diabètica (PND) és una de les complicacions secundàries més freqüents de la diabetis mellitus. Provoca un empobriment de la qualitat de vida dels malalts, causa dolor i úlceres i, en última instància, amputació de l'extremitat afectada. La patogènia és multifactorial, hi ha alteracions estructurals en els nervis perifèrics i els tractaments actuals són simptomàtics, no específics i poc efectius.

El ratolí transgènic RIP/INF β és un model de diabetis, que mimetitza la diabetis autoimmune humana, provocant la destrucció de les cèl·lules β pancreàtiques, que s'intensifica amb l'administració de dosis baixes repetides d'estreptozotocina (STZ).

Partint de la base de que els processos biològics implicats en la degeneració i regeneració dels nervis perifèrics estan controlats pels ganglis de les arrels dorsals (GAD), l'objectiu d'aquesta tesi ha estat analitzar l'expressió gènica i els processos biològics que esdevenen en els GAD del nervi ciàtic després d'un traumatisme, en el ratolí transgènic RIP/INF β tractat amb dosis baixes i repetides de STZ (Tg-STZ).

S'ha treballat amb els GAD del nervi ciàtic de ratolins, en diferents condicions experimentals: controls ICR (ICR) atès que els ratolins transgènics presenten aquest fons genètic; ICR tractats amb STZ (ICR-STZ); transgènics RIP/INF β (Tg); i Tg tractats amb STZ (Tg-STZ). Quatre setmanes després de considerar-ne instaurada la diabetis en els Tg-STZ, tots els animals van ser sotmesos a una lesió per aixafament en el nervi ciàtic de l'extremitat esquerra, mantenint la dreta intacta. Quatre setmanes després de la lesió es van prendre mostres dels GAD del nervi ciàtic d'ambdues extremitat. Es va extreure el RNA dels GAD per realitzar els estudis de *microarrays* (*Affymetrix GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Array*). Per validar els valors de l'expressió gènica es va realitzar una PCR quantitativa en temps real (RT-qPCR).

Es van realitzar comparacions dels perfils gènics entre les diferents condicions experimentals: 1) ICR-STZ lesionades vs ICR lesionades; 2) ICR lesionades vs ICR no lesionades; 3) Tg-STZ no lesionades vs ICR no lesionades; i 4) Tg-STZ lesionades vs ICR lesionades. Les mostres de referència van ser els GAD de l'extremitat no lesionada dels ratolins ICR (*baseline*) amb un *fold change* (FC) de 1. Un cop obtinguts els perfils de les comparatives es van analitzar els gens sobrerregulats i infrarregulats, i els processos biològics implicats, amb diferents bases de dades (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery; Center for Quantitative Biology; Gene Home*).

L'absència de diferències en l'expressió gènica entre els GAD de les extremitats lesionades dels animals ICR-STZ vs ICR, indica que, en aquests òrgans, la STZ no té un efecte neurotòxic.

En animals control ICR a les 4 setmanes després d'una lesió en el nervi ciàtic, encara es sobreexpressen gens relacionats amb la regeneració nerviosa, que participen en les vies de senyalització (Gpr151, Nts), transmissió sinàptica (Npy), projeccions neuronals i guia de l'axó (Sox11, Atf3, Tnc, Sema6a, Sprr1a, Gal), el que indicaria que la lesió encara no està totalment resolta.

En animals transgènics (Tg-STZ) diabètics, la infrarregulació de gens relacionats amb vies metabòliques (Vgf) i la sobrerregulació de gens implicats en el metabolisme de hidrats de carboni (Car3) i lípids (Gdpd3), indicaria que a les 8 setmanes d'iniciar el procés diabètic els GAD estarien afectats per la hiperglucèmia.

En animals transgènics (Tg-STZ) diabètics, 8 setmanes després de començar la hiperglucèmia, la infrarregulació de gens implicats en desenvolupament del sistema nerviós (Gal, Bdnf, Erg3), regeneració axonal (Sprr1a, Lingo1), transmissió sinàptica (Calb1, Snapin), transducció de senyals (Nts, Rgs2), canals de potassi (Kcns1, Kcnq5, Knj13,

Kcna6, Kcnt1) i apoptosi (Tfnaip, Ctsb, E2f1, Crh), indicaria l'existència de canvis degeneratius en els GAD deguts a la neuropatia diabètica.

En animals transgènics (Tg-STZ) diabètics, 4 setmanes després d'una lesió per aixafament del nervi ciàtic, la sobreexpressió de gens relacionats amb guia de l'axó (Foxd1), regeneració axonal (Sprr1a), projeccions neuronals (Mapk8), supervivència de les neurones dels GAD i elongació de les neurites (Gal, Sox11), o de vies de senyalització nerviosa (Npy1r, Igf1, Rgs18, Gpr151), transmissió sinàptica (Gabrb3, Neto1, Cckbr) i apoptosi (Crh), assenyalaria que en els GAD hi ha processos de regeneració posttraumàtica.

En animals transgènics (Tg-STZ) diabètics, 4 setmanes després d'una lesió per aixafament del nervi ciàtic, la infraexpressió de gens relacionats amb l'axogènesi (Nptx1, Cxcr4), transmissió sinàptica neuromuscular (Egr3) i transport de substàncies (Htr3a, Tnpo, Mlc1, Slc15a2, Slc6a4), mostraria un alentiment de la regeneració nerviosa.

En animals control ICR a les 4 setmanes després d'una lesió en el nervi ciàtic, la sobrerregulació de gens implicats en reorganització o remodelació de la matriu extracel·lular (MEC) i del microambient local a la part lesionada (Mmp16, Col18a1, Col3a1, Col5a2, Loxl2) i d'adhesió cel·lular (Lmo7, Flrt3), i transport de substàncies (Cacna2d1, Slc15a3, Slc15a9, Slc6a4) i apoptosi (Phb, Comp), indicaria que hi ha regeneració i remodelació a la part lesionada.

En animals transgènics (Tg-STZ) diabètics, els processos de reorganització i remodelació de la MEC quasi no estan sobrerregulats, excepte Mmp16 i Tgfbi amb un FC>2, el que confirmaria que la regeneració estaria retardada, i encara no s'haurien iniciat els fenòmens de remodelació local.

En animals control ICR a les 4 setmanes després d'una lesió en el nervi ciàtic, hi ha sobreexpressió de gens relacionats amb el dolor neuropàtic (Npy, Npy2r, Gal) i en animals transgènics (Tg-STZ) no hi ha expressió de Npy, i el gen Gal està infrarregulat. Això podria estar relacionat amb la pèrdua de la sensibilitat al dolor que s'observa en els pacients amb PND.

El coneixement dels gens i els processos biològics involucrats en la degeneració i regeneració nerviosa en ratolins sans ICR i en ratolins transgènics Tg-STZ diabètics, obre noves vies de recerca per aprofundir en el coneixement de la patogènia de la PND i per l'estudi de molècules diana en el tractament de la PND i del dolor neuropàtic.

Diabetic neuropathy (PND) is the most frequent secondary complication of diabetes mellitus (DM). The most important contributors to reduction in the quality of life of patients with DM are neurological pain and foot ulcerations and, ultimately, non-traumatic amputation of the affected limb. The pathogenesis is multifactorial, there are structural changes in the peripheral nerves and current treatments remain largely symptomatic, non-specific and not uniformly effective.

Transgenic diabetic RIP/INF β mice when treated with low doses of streptozotocin (STZ) present with pancreatic β -cell destruction, mimicking autoimmune diabetes in humans.

On the basis that mechanisms governing peripheral nerve degeneration and regeneration are controlled by dorsal root ganglion (GAD), the aim of this thesis was to characterize gene expression, and thus the biological processes that take place in the GAD of injured sciatic nerve, of transgenic RIP/INF β mice treated with multiple low doses of STZ (Tg-STZ).

Gene expression in GAD was studied in four different groups of mice: wild type ICR (ICR) as a wild type genetic background control; ICR treated with STZ (ICR-STZ); transgenic RIP/INF β mice (Tg); and Tg mice treated with STZ (Tg-STZ). Four weeks after diabetes was established in Tg-STZ mice, a left sciatic nerve crush injury was performed in all groups, the right limb was left intact. Four weeks after sciatic nerve injury GAD samples were collected from both hind limbs. GAD RNA was extracted to perform microarray study (Affymetrix GeneChip $^{\text{®}}$ Mouse Genome 430 2.0 Array). Real time PCR (RT-qPCR) was performed to validate some of gene expression values obtained.

Comparisons were made between the gene profiles from the different experimental conditions: 1) ICR-STZ injured vs ICR injured, 2) ICR injured vs ICR uninjured, 3) Tg-STZ uninjured vs ICR uninjured and 4) Tg-STZ injured vs ICR injured. Baseline samples were the uninjured limbs from ICR mice with a Fold Change value of 1.

Once the compared profiles were obtained, upregulated and downregulated genes were analysed, as well as their related biological process, using different databases (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery; Center for Quantitative Biology; Gene Home).

The absence of differences in gene expression between injured limbs GAD from ICR-STZ mice vs ICR mice showed that STZ administration had no toxic effect in GAD.

Four weeks after sciatic nerve injury, genes associated with nerve regeneration were still upregulated in ICR mice, particularly those involved in signalling (Gpr151, Nts), synaptic transmission (Npy), neuronal projection and axonal guidance (Sox11, Atf3, Tnc, Sema6a, Sprr1a, Gal). This finding indicates that the lesion was not completely resolved.

Transgenic diabetic mice (Tg-STZ) showed downregulation of genes related to metabolic pathways (Vgf) and upregulation of genes implicated in carbohydrate (Car3) and lipid metabolism (Gdgd3), indicating that 8 weeks after DM onset, a sustained hyperglycaemia affects GAD.

Transgenic diabetic mice (Tg-STZ) showed, after 8 weeks of sustained hyperglycaemia, downregulation of genes associated with nervous system development (Gal, Bdnf, Erg3), axonal regeneration (Sppr1a, Lingo1), synaptic transmission (Calb1, Snapin), signal transduction (Nts, Rgs2), potassium channel (Kcns1, Kcnq5, Knj13, Kcna6, Kcnt1) and apoptosis (Tfnaip, Ctsb, E2f1, Crh). Reflecting GAD degenerative changes due to PND.

Four weeks after sciatic nerve injury, genes associated with nerve regeneration were still upregulated in diabetic transgenic mice (Tg-STZ) such as those involved in axon guidance (Foxd1), axonal regeneration (Sprr1a), neuronal projection (Mapk8), GAD neurons survival and neurite elongation (Gal, Sox11), or signalling (Npy1r, Igf1, Rgs18, Gpr151), synaptic transmission (Gabbr3, Neto1, Cckbr) and apoptosis (Crh). Suggesting ongoing posttraumatic GAD regeneration processes.

Four weeks after sciatic nerve injury, several genes were downregulated in diabetic transgenic mice (Tg-STZ) involved in axogenesis (Nptx1, Cxcr4), neuromuscular synaptic transmission (Egr3) and transport (Htr3a, Tnpo, Mlc1, Slc15a2, Slc6a4), evidencing delayed nerve regeneration.

Four weeks after sciatic nerve injury, genes associated with nerve regeneration were still upregulated in ICR mice, involved in extracellular matrix (MEC) reorganization and local microenvironment (Mmp16, Col18a1, Col3a1, Col5a2, Loxl2), cell adhesion (Lmo7, Flrt3), transport (Cacna2d1, Slc15a3, Slc15a9, Slc6a4) and apoptosis (Phb, Comp) indicating reorganization and regeneration of the injured site.

Transgenic diabetic mice (Tg-STZ) only showed upregulation of 2 genes (Mmp16, Tgfb1) related to MEC reorganization. The remaining genes were barely upregulated. This finding is in accordance with a delayed regeneration, and with the fact that local remodelling is yet to be started.

Four weeks after sciatic nerve injury, genes associated with neuropathic pain were upregulated in ICR mice (Npy, Npy2r, Gal). However, in diabetic transgenic mice Tg-STZ, no Npy expression was found and, moreover, Gal was downregulated. This finding could be related to PND loss of pain sensitivity.

Our findings regarding genes and biological processes involved in nerve degeneration and regeneration mechanisms in ICR mice and in diabetic transgenic mice Tg-STZ lead to new research lines aimed to understanding PND pathogenesis and to the study of target therapeutic molecules for PND and diabetic pain.

II. INTRODUCCIÓ

1. EL SISTEMA NERVIÓS

El sistema nerviós (SN) en mamífers està format per dues parts, el sistema nerviós central (SNC) i el sistema nerviós perifèric (SNP) (DeLahunta, 1983). El SNC es troba protegit per les meninges i per l'os del crani i està format per l'encèfal, cervell, cerebel i tronc de l'encèfal, i la medul·la espinal. La medul·la espinal està protegida per la columna vertebral.

El SN està compost principalment pel teixit nerviós, on s'hi troben dos tipus de cèl·lules, les neurones i les cèl·lules glials (DeLahunta, 1983). Les neurones són cèl·lules excitables i la seva funció és captar i transmetre l'impuls nerviós en el SN. Les neurones presenten unes característiques morfològiques d'acord amb les funcions que realitzen, tenen una zona receptora i una zona efectora dels impulsos nerviosos. La zona receptora està constituïda pel cos cel·lular anomenat soma (o pericarió), diverses prolongacions curtes, les dendrites, i la zona conductora, l'axó, que és una única prolongació llarga. La zona efectora està formada per terminals axònics que s'encarreguen de la transmissió dels impulsos nerviosos des del soma cap a una altra neurona o òrgan diana (DeLahunta, 1983).

La funció de les cèl·lules glials és donar suport mecànic a les neurones, aïllar-les i protegir-les, controlar els nivells extracel·lulars de metabòlits i sintetitzar la beina de mielina que envolta als axons de les neurones (D'Antoni et al, 2008; Yang et al, 2008; Gomez-Gonzalo et al, 2010).

1.1. EL SISTEMA NERVIÓS PERIFÈRIC

El SNP està format pels nervis i per les neurones que resideixen fora del SNC. El SNP no està protegit per estructures òssies.

Al SNP hi ha dos tipus de neurones, les motores i les sensorials. Les neurones motores són eferents, transmeten la informació des del SNC a la resta del cos, als òrgans i als músculs. Les neurones sensorials són aferents, actuen a la inversa, i reben la informació des de diferents parts de l'organisme, estímuls externs o d'òrgans interns, i la transmeten al SNC. Cada tipus neuronal té els seus axons, les neurones motores tenen axons motors i les sensorials, axons sensorials. En funció de la cèl·lula diana les neurones motores es classifiquen en tres grans grups, les motoneurones somàtiques que innerven directament als músculs esquelètics, les motoneurones branquials que innerven als músculs de la cara i del coll, i les motoneurones viscerals que innerven el múscul llis visceral i el múscul cardíac (DeLahunta, 1983).

El SNP motor es divideix en el SN somàtic i el SN autònom (SNA). El SNA es divideix en el SN simpàtic i SN parasimpàtic. El SN somàtic està format per neurones sensorials, que envien la informació des dels receptors sensorials dels músculs esquelètics o dels òrgans sensorials externs fins al SNC, i per neurones motores, que condueixen els impulsos nerviosos fins als músculs esquelètics. És a dir, que el SN somàtic agrupa totes les estructures del SNC i SNP encarregades de conduir informació de control motor des del múscul esquelètic (Aige, 2001).

El SN somàtic inclou els nervis espinals i cranials. Els nervis espinals condueixen la informació sensorial del tronc i les extremitats cap al SNC a través de la medul·la espinal, i es retornen les ordres motores des de la medul·la espinal cap a la musculatura esquelètica (Aige, 2001).

1.1.1. EL NERVI PERIFÈRIC

Els axons de les neurones s'agrupen en feixos nerviosos anomenats tractes nerviosos en el SNC i nervis perifèrics en el SNP. Els nervis perifèrics són els cranials i els espinals, contenen axons aferents i axons eferents i poden estar o no mielinitzats (DeLahunta, 1983).

Els nervis espinals són parells i cada parell està associat a un segment de la medulla espinal (Fig1).

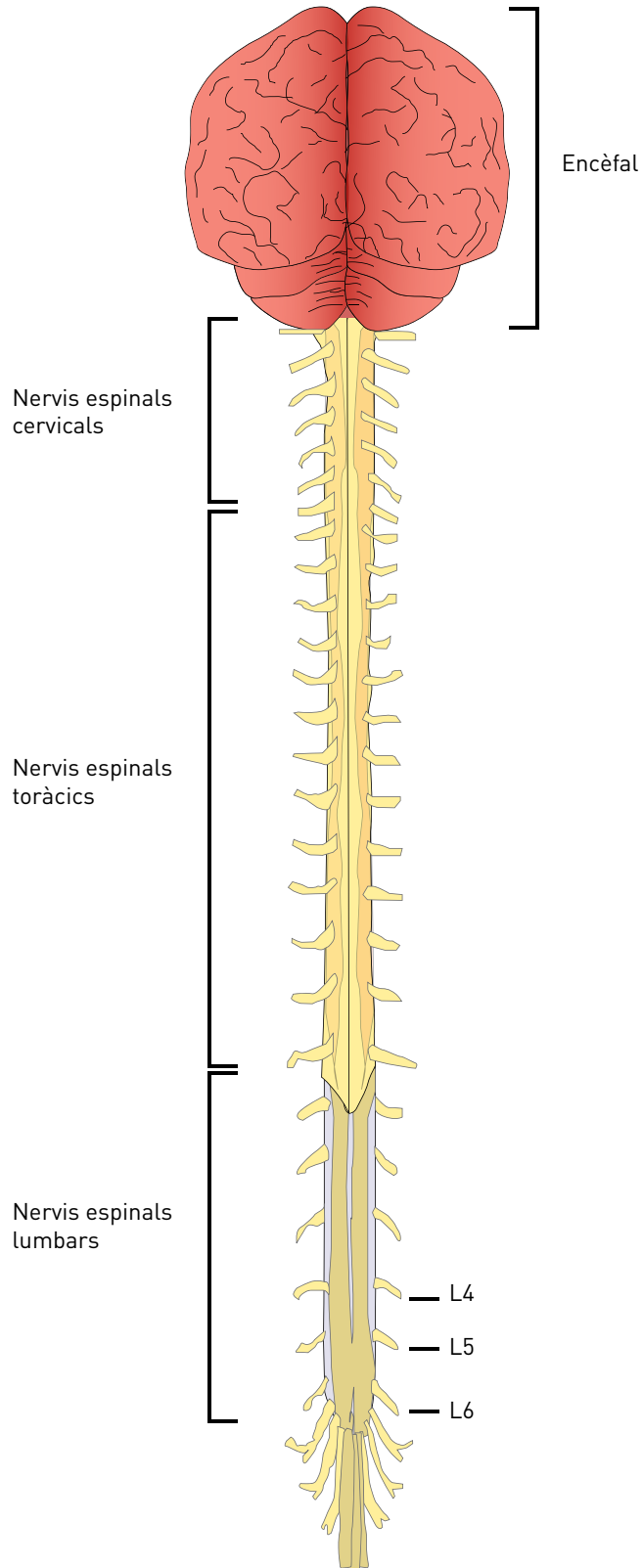


Figura 1.
Esquema dels
nervis espinals.

Cada nervi connecta amb la medul·la espinal per dues arrels, una ventral formada per fibres eferents, majoritàriament motores, i una dorsal per fibres aferents, majoritàriament sensibles (Fig2).

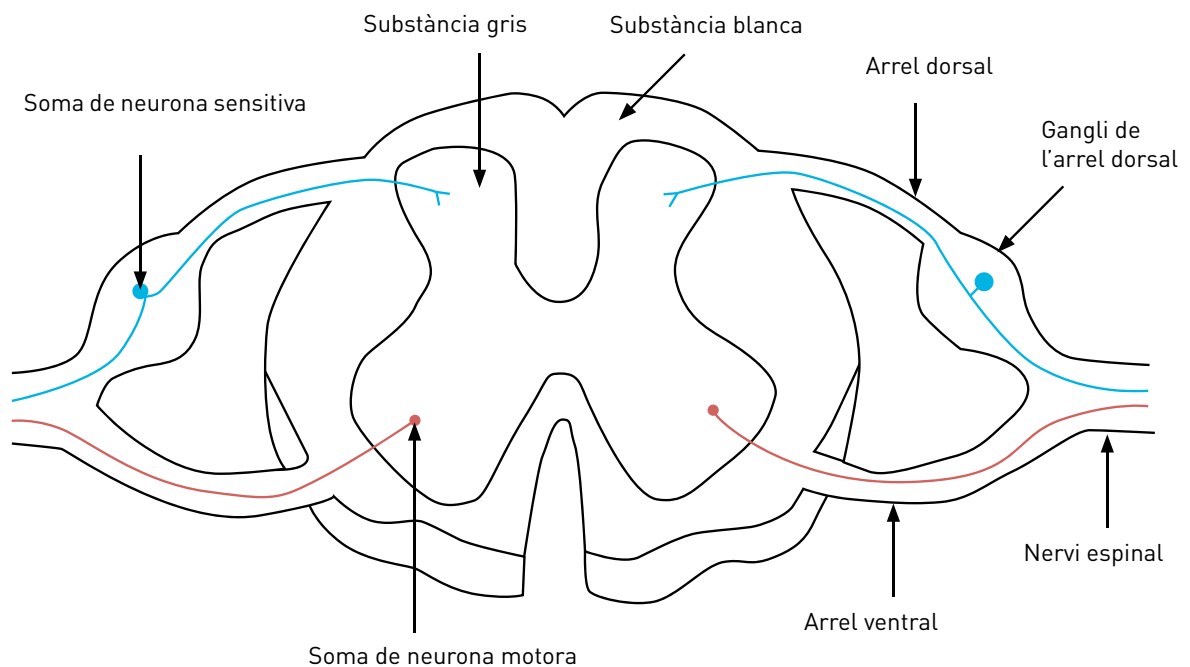


Figura 2. Esquema anatòmic de la medul·la espinal i la localització dels ganglis de les arrels dorsals (GAD).

Els nervis perifèrics estan protegits per la beina de mielina produïda per les cèl·lules de Schwann. Les cèl·lules de Schwann són cèl·lules glials perifèriques que tenen un paper important en el creixement i desenvolupament de la prolongació de l'axó. Les cèl·lules de Schwann estan sostingudes per una làmina basal. Aquestes cèl·lules rodegen de manera espiral l'axó fent capes concèntriques i formant la beina de mielina protectora. Les molècules extracel·lulars de la làmina basal, regulen aspectes clau sobre el desenvolupament de la cèl·lula de Schwann que inclouen la formació, arquitectura i funció de la mielina (Court et al, 2006). Al llarg de tot l'axó hi ha petites zones circulars sense mielina que coincideixen amb els límits entre cèl·lules de Schwann i s'anomenen nodes de Ranvier. La funció de les cèl·lules de Schwann és fer d'aïllant elèctric de l'axó gràcies a la mielina. Aquest aïllant fa que la senyal avanci sense perdre intensitat, i que es produeixi l'anomenada conducció saltatòria. Les cèl·lules de Schwann també ajuden a guiar el creixement dels axons en la regeneració de les lesions dels axons perifèrics (Ide et al, 1983; Kierszenbaum, 2012) (Fig3).

El citoplasma dels axons conté mitocondris, lisosomes, reticle endoplasmàtic llis organitzat a la perifèria de l'axó i amb un citoesquelet ordenat, format per neurotúbuls, neurofilaments i vesícules que contenen neurotransmissors.

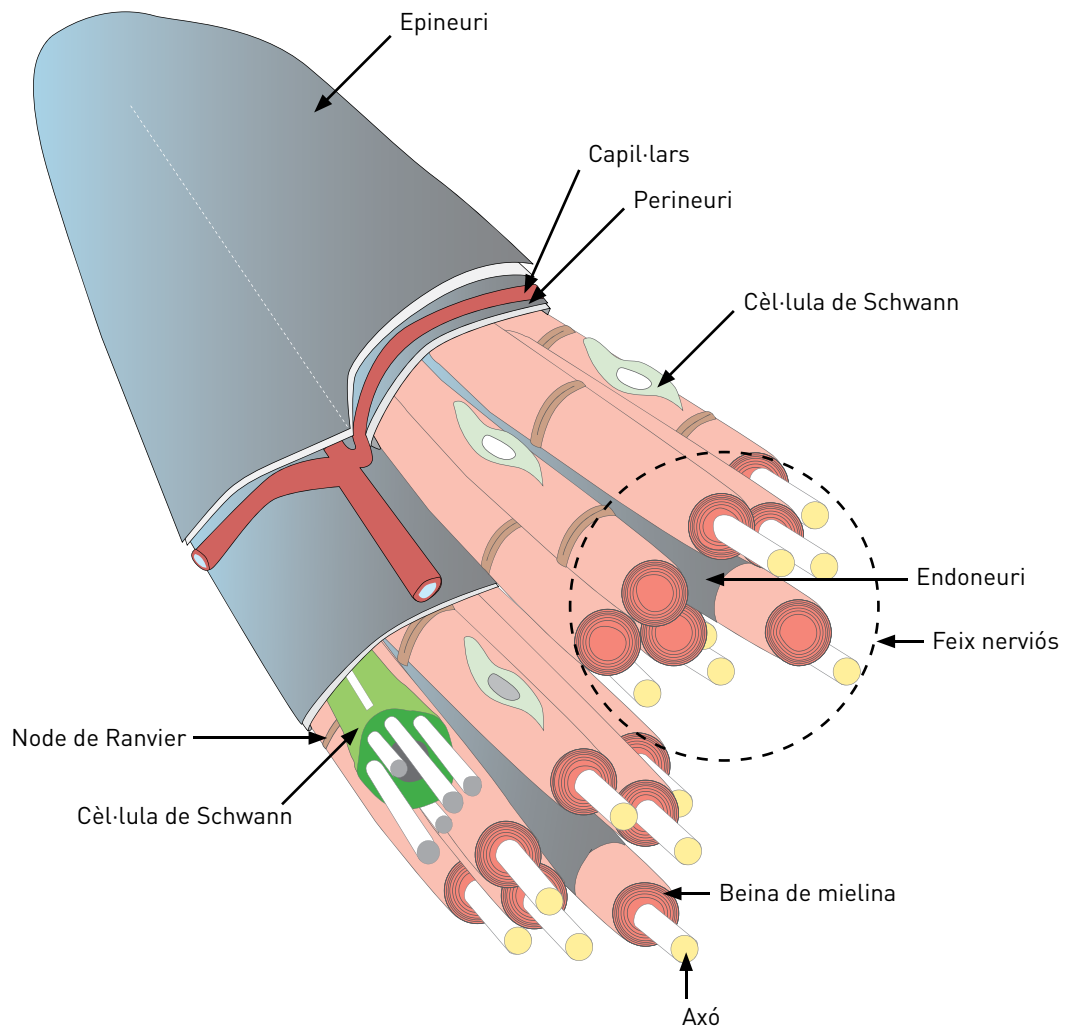


Figura 3. Estructura d'un nervi perifèric. Adaptat de Kierszenbaum, 2012.

Els nervis perifèrics tenen tres capes addicionals de recobriment de teixit conjuntiu: l'epineuri, el perineuri i l'endoneuri. L'epineuri està format per col·lagen de tipus I i fibroblasts i recobreix al nervi sencer.

Dins del nervi, el perineuri separa grups d'axons formant feixos nerviosos. El perineuri està format per múltiples làmines concèntriques de fibroblasts amb dues característiques especials, tenen una làmina basal que envolta les capes de fibroblasts i entre ells hi ha unions estretes. Aquesta estructura forma una barrera protectora, la barrera sang-nervi.

L'endoneuri envolta a cada axó individualment i a la cèl·lula de Schwann que hi ha associada. Està format per escasses fibres de col·lagen de tipus III i alguns fibroblasts situats entre les fibres nervioses individuals. Components addicionals de la barrera sang-nervi són les cèl·lules endotelials dels capil·lars endoneurals. Els capil·lars endoneurals vénen del *vasa nervorum* i estan formats per un endoteli continu (Kierszenbaum, 2012).

1.1.2. EL GANGLI DE L'ARREL DORSAL

Els axons dels nervis sensitius tenen els seus cossos neuronals situats en uns engruiximents just abans de l'entrada al canal vertebral, que s'anomenen ganglis de les arrels dorsals (GAD) (Fig2).

Els GAD estan protegits per teixit conjuntiu que es continua amb l'epineuri i del perineuri del nervi perifèric associat. Les neurones són pseudounipolars. El cos neuronal és esfèric i està rodejat per una capa de cèl·lules aplanades anomenades cèl·lules satèl·lit o amfícits. Aquestes cèl·lules, similars a les cèl·lules de Schwann, estan sostingudes per una làmina basal i proporcionen a les neurones protecció, sosteniment estructural i metabòlic (Tucker et al, 2008) (Fig4). Les neurones pseudounipolars tenen un axó aferent que es divideix en dues branques: en el procés proximal,

que entra al SNC, i en el procés distal que va al SNP (Kierszenbaum, 2012).

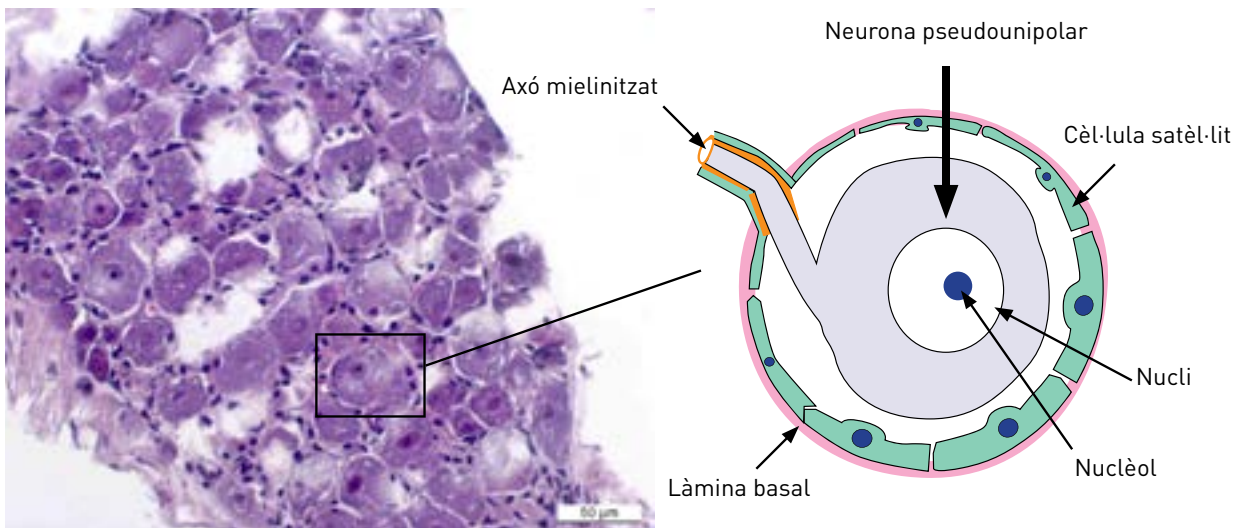


Figura 4. Secció histològica d'un gangli de l'arrel dorsal del nervi ciàtic. Tinció Hematoxilina-Eosina. Esquema d'una neurona pseudounipolar. Adaptat de Kierszenbaum, 2012.

L'impuls nerviós s'inicia en el procés distal, passa pel cos neuronal i es propaga pel procés proximal fins que arriba al terminal sinàptic de l'asta dorsal de la medulla espinal.

Les neurones sensibles dels GAD tenen receptors associats a proteïnes G i juguen un paper important en la nocicepció. Els terminals nerviosos tenen una gran varietat de receptors sensitius que s'activen per estímuls mecànics, tèrmics, químics o dolorosos (Cho et al, 2002). En aquestes neurones sensibles hi ha canals iònics que són els responsables d'identificar la traducció somatosensorial. Quan un estímulo mecànic arriba a un gangli, es redueix el llindar necessari per evocar una resposta i enviar un potencial d'acció, que persisteix durant un temps, tot i que l'estímul s'hagi retirat. Els canals iònics mecanosensitius són catiónics i la seva activitat sembla estar regulada per proteïnes associades al citoesquelet. Poden tenir un llindar de susceptibilitat alt o baix. Els canals d'alt llindar tenen un rol en la nocicepció i es troben en les neurones sensibles i s'activen amb les altes pressions (Cho et al, 2002).

1.1.3. EL NERVI CIÀTIC

Un dels parells de nervis més importants del SNP és el nervi ciàtic, que innerva les extremitats posteriors dels mamífers. Per a cada nervi ciàtic hi ha tres parells de GAD localitzats a les tres últimes vertebres lumbars (L4, L5 i L6). Aquest nervi recorre les extremitats inferiors fins a arribar a l'alçada de la ròtula on es trifurca en nervi sural, tibial anterior i tibial posterior. A l'arribar al tars els tres nervis es ramifiquen i innerven tota la superfície del peu (Dyce, 1999).

1.2. DEGENERACIÓ I REGENERACIÓ DEL SISTEMA NERVIÓS PERIFÈRIC

En els processos de degeneració nerviosa, com en la DM, l'afectació comença en les terminacions nervioses dels

coixinets i parts més distals de l'extremitat posterior i va progressant anterògradament cap als nervis tibials i sural fins a arribar a afectar retrògradament el nervi ciàtic (Sugimoto et al, 2000).

Les neurones del SNP posseeixen una gran capacitat regenerativa i després d'una lesió en un nervi perifèric acostumen a regenerar els seus axons sempre i quan es trobin en un ambient permissiu per a que això succeeixi (Fudge i Mearow, 2013). Per contra, les neurones del SNC no regeneren eficientment (Shim i Ming, 2010).

La regeneració del SNP és una complicada seqüència temporal de processos cel·lulars i metabòlics que es poden agrupar, en grans trets, en 4 passos (Vargas i Barres, 2007):

- La degeneració Walleriana i la resposta retrògrada dels cossos neuronals
- L'elongació axonal
- La reinnervació del segment nerviós lesionat
- La maduració de la fibra nerviosa

Després d'un dany en un nervi, ja sigui per aixafament o axotomia, es produeixen canvis proximals i distals a la lesió. Les fibres nervioses distals al lloc lesionat queden desconnectades del cos neuronal i es produeix una degeneració Walleriana (Hall, 2005). La degeneració Walleriana seguint els experiments sobre transecció nerviosa fets per August Waller (Waller, 1850) es descriu clàssicament com la degeneració dels axons distal a una lesió. Les cèl·lules de Schwann dins la làmina basal proliferen i migren formant cordons, les bandes de Büngner, que ajuden a que hi hagi un ambient permissiu per al creixement i esdevenen una guia per l'axó en regeneració durant la seva elongació (Campbell, 2008)

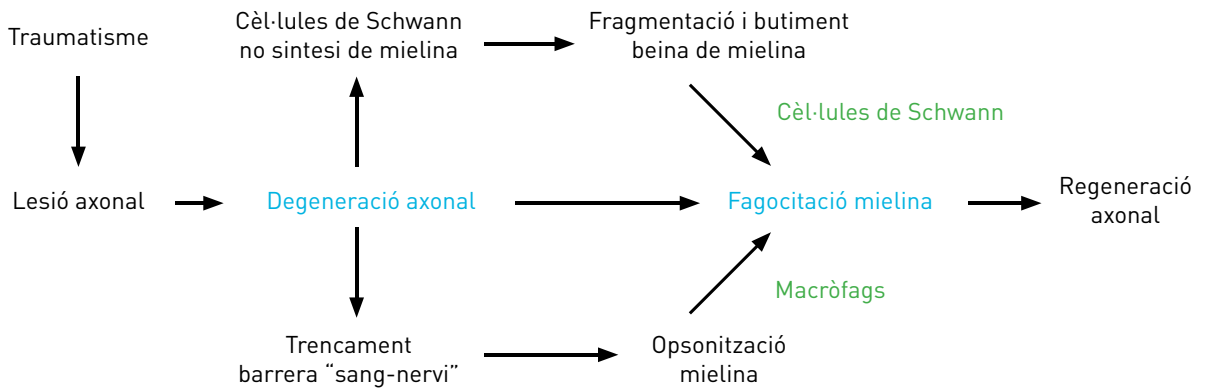


Figura 5. Esquema de la successió de la degeneració Walleriana. Adaptat de Vargas i Barres, 2007.

Quan l'axó perd la connexió amb les neurones es desintegra el citoesquelet de l'axó, les cèl·lules de Schwann comencen a dividir-se i deixen de sintetitzar proteïnes de mielina. Les beines de mielina se separen en diferents fragments, es boteixen i acaben replegant-se i col·lapsant la cavitat que estava ocupada per l'axó. De 2 a 3 dies després de la lesió, els macròfags travessen la làmina basal del perineuri, infiltrin l'endoneuri de la fibra lesionada, i juntament amb les cèl·lules de Schwann fagociten les restes d'axó i de mielina danyada (Vargas i Barres, 2007) (Fig5).

Els macròfags reclutats alliberen citocines relacionades amb la proliferació de cèl·lules de Schwann. Els principals canvis en les cèl·lules de Schwann activades, degut a la denervació, inclouen una disminució en la regulació de les proteïnes que sintetitzen la mielina i en la síntesi de factors neurotròfics i de molècules d'adhesió cel·lular. Les citocines alliberades per les cèl·lules de Schwann també indueixen la proliferació de mastòcits, fibroblasts i cèl·lules endotelials (Perry i Brown, 1992; Brük, 1997; Frostick, et al. 1998; Madduri i Gander, 2012).

En el procés de regeneració es parla de con de regeneració axonal fent referència a l'extrem més distal de l'axó o la dendrita lesionat. Es tracta d'una estructura dinàmica que permet el creixement de l'axó en desenvolupament i que busca la seva diana sinàptica. A l'extrem del con de regeneració presenta unes fines extensions de fil·lopodis i filaments d'actina (F-actina) que li donen forma i suport. En el seu domini central la part més propera a l'axó conté un citoesquelet format per microtúbuls (Dent et al, 2003). Els fil·lopodis a la seva membrana contenen receptors i molècules d'adhesió cel·lular que actuen com a guia en el creixement de l'axó (Verdu et al, 2000; Navarro et al, 2007) (Fig6).

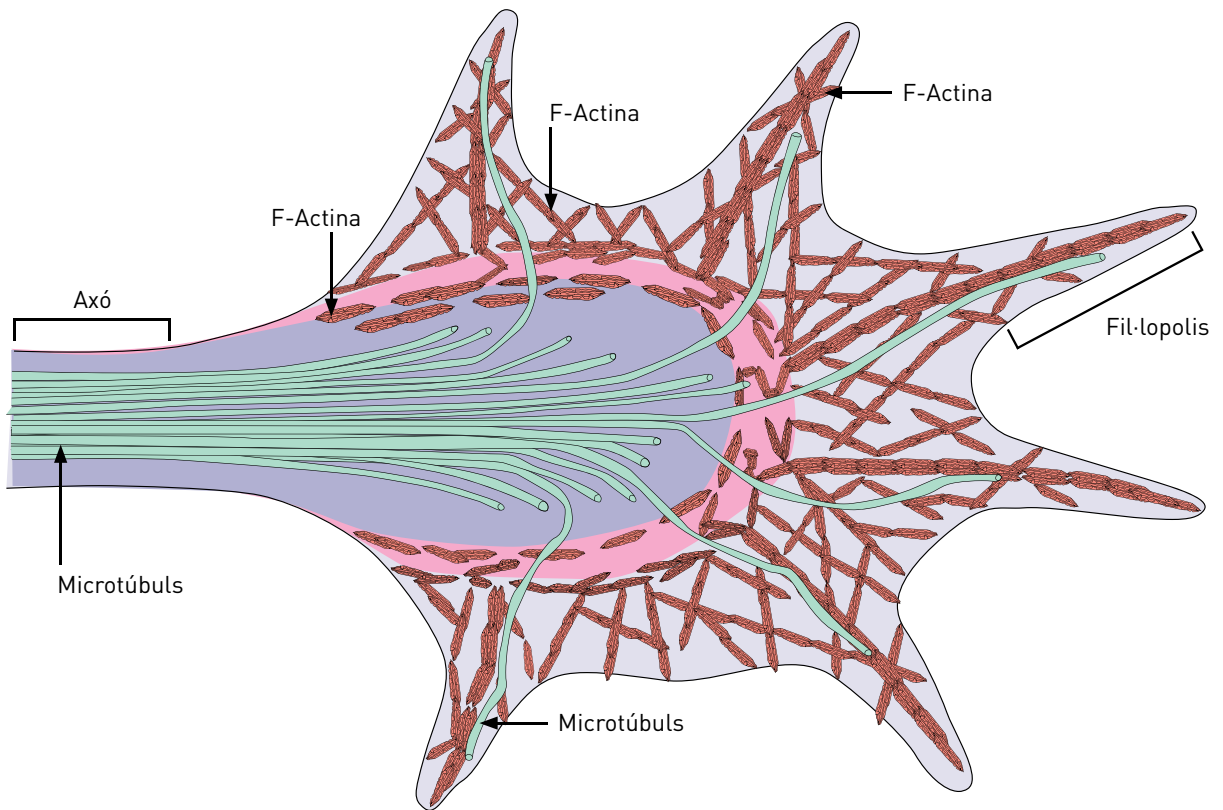
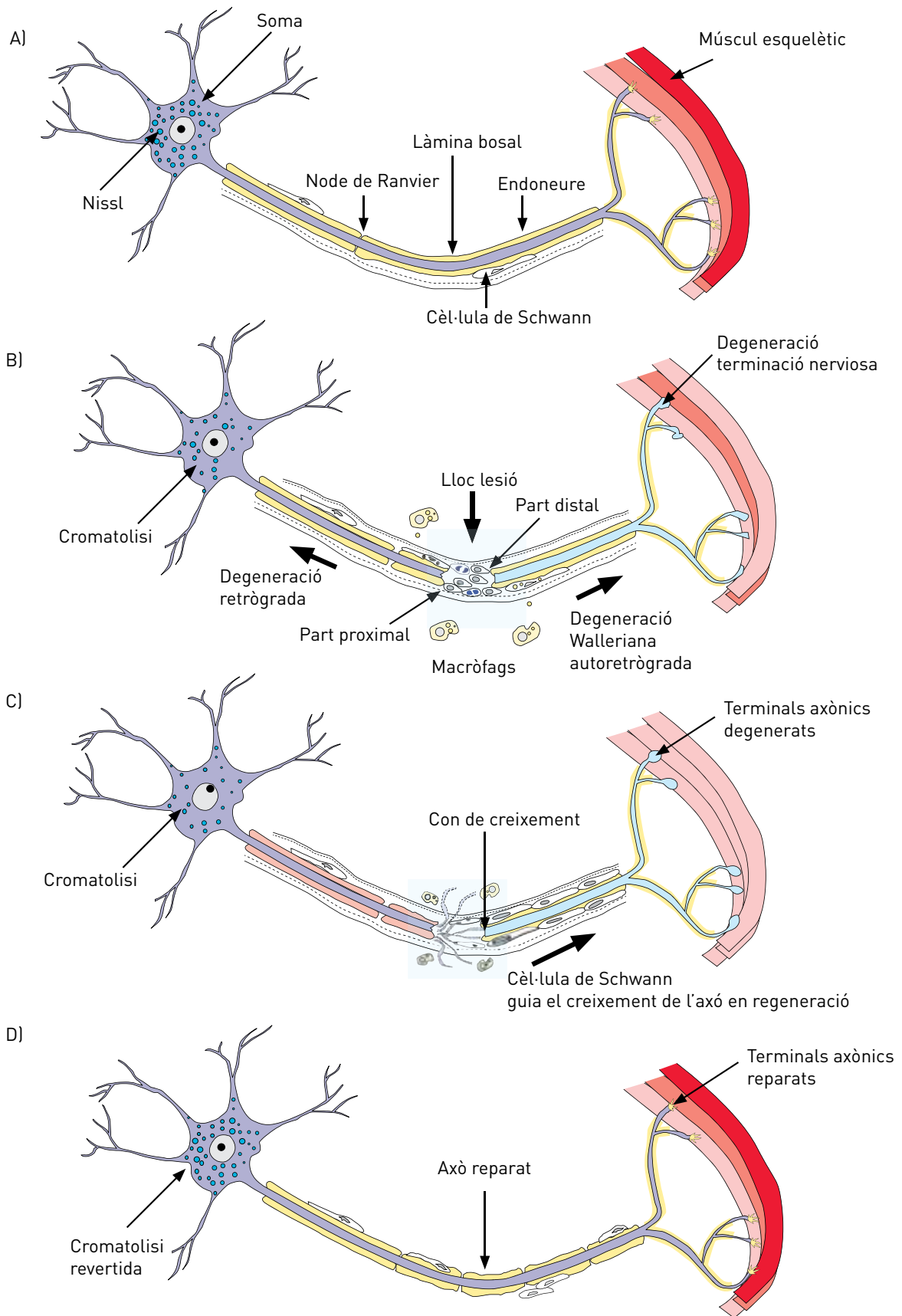


Figura 6. Esquema del con de regeneració axonal. Adaptat de Lowery i Vactor, 2009.

Després del dany nerviós, el cos neuronal corresponent al nervi lesionat, ubicat al GAD, rep informació sobre el lloc exacte i l'extensió del dany axonal mitjançant transport retrògrad de fluxos iònics i factors tròfics (Abe i Cavalli, 2008). La reacció retrògrada del cos neuronal inclou canvis en seu el metabolisme i modificació en la seva expressió gènica que dóna suport al procés d'elongació axonal. S'expressen gens que codifiquen per a components del con de creixement axonal, com actina o tubulina, i proteïnes associades al creixement, (Vargas i Barres, 2007) (Fig7).

En la reacció retrògrada s'activen les cèl·lules satèl·lit adjacents al cos de la neurona danyada i altres cèl·lules dels tractes de fibres nervioses distals per a que comenci la regeneració nerviosa perifèrica (Makwana i Raivich, 2005). Les molècules activades al lloc de la lesió transmeten la informació al cos neuronal (Hanz i Fainzilber, 2006; Navarro et al, 2007) de manera que permeten l'expressió de gens associats a la regeneració i incrementen la capacitat de creixement de la neurita (Abe i Cavalli, 2008). Aquesta resposta molecular involucra a nombrosos factors de transcripció i de creixement, molècules d'adhesió, components estructurals (Reid et al, 2010) i molècules de comunicació de cèl·lula a cèl·lula (Makwana i Raivich, 2005). En el GAD, després d'una lesió al SNP, incrementa l'expressió de gens que codifiquen per neuropèptids i citocines que promouen el creixement de les neurites (Boeshore et al, 2005; Makwana i Raivich, 2005; Hökfelt et al, 2008;), com per exemple, la neurotensina (Nts), el neuropèptid Y (Npy), la galanina (Gal) i l'*activating transcription factor 3* (Atf3) (Kataoka et al, 2007; Saito i Dahlin, 2008).



S'ha descrit que als 30 segons després d'una lesió nerviosa hi ha els primers signes de degeneració axonal aguda, es tracta de ràpids influxos iònics de calci (Kerschensteiner et al, 2005). La membra axonal s'inflama o boteix entre les 8 i 24 hores després de la lesió (Sievers et al, 2003; Zhai et al, 2003). La degeneració Walleriana en mamífers tarda entre 7 i 14 dies en portar-se a terme (George i Griffin, 1994; Vargas, 2007).

Estudis previs realitzats pel nostre grup d'investigació han demostrat, en ratolins, signes de regeneració nerviosa a les 4 setmanes després d'una lesió per aixafament del nervi ciàtic (Serafin et al, 2010) .

Figura 7. Degeneració i regeneració després d'una lesió nerviosa. (A) Fibra nerviosa no lesionada. (B) Fibra nerviosa lesionada, hi ha una reacció retrògrada cap al soma de la neurona i comença la degeneració Walleriana distal a la lesió. (C) Brots axonals de la part pròxima de l'axó s'elonguen seguint la làmina basal de les cèl·lules de Schwann. (D) Reinnervació de la fibra muscular diana i maduració de la fibra nerviosa.

2. DIABETIS MELLITUS

La associació americana de Diabetis, *American Diabetis Association* (ADA), descriu que la diabetis mellitus (DM) és un trastorn multifactorial i multisistèmic que es caracteritza per una hiperglucèmia causada per una reducció de la secreció d'insulina, un dèficit en la seva acció o ambdues coses. La insulina és una hormona polipeptídica produïda i secretada per les cèl·lules β dels illots de Langerhans pancreàtics. La seva funció és permetre l'entrada de la glucosa en sang dins les cèl·lules dels diferents òrgans i teixits, per exemple al fetge, al múscul o al teixit nerviós, i ser convertida en l'energia que aquests òrgans i teixits necessiten per al seu correcte funcionament. La DM és una malaltia metabòlica complexa en la que coexisteixen alteracions en el metabolisme dels hidrats de carboni, greixos i proteïnes (DeFronzo et al, 2004). La hiperglucèmia sostinguda amb el pas del temps acaba provocant dany tissular (DeFronzo et al, 2004).

2.1. TIPUS DE DIABETIS MELLITUS

En funció de la seva etiologia i manifestació clínica la DM es pot classificar en diferents tipus: el tipus I, el tipus II, la diabetis gestacional o altres tipus més específics, tot i que els més comuns són el tipus I (DM tipus I) i el tipus II (DM tipus II) (<http://www.who.int/diabetes.html>).

La DM tipus I, que també s'anomena diabetis juvenil, sol començar en edats primerenques, encara que també pot ocórrer en edats adultes. Aquest tipus ve donat per la destrucció de les cèl·lules β del pàncrees, degut a processos autoimmunes o idiopàtics. El cos no produeix l'hormona, per tant, els pacients amb DM tipus I depenen de l'administració d'insulina extrínseca per sobreviure. Menys del 10% dels malalts diabètics pateixen el tipus I. El procés de desenvolupament de la malaltia és gradual, hi ha predisposició genètica i hi contribueixen factors ambientals

o autoimmunitat activa. La destrucció de les cèl·lules β desencadena la presentació progressiva dels símptomes propis de la malaltia (DeFronzo et al, 2004).

En el desenvolupament de la DM tipus I es considera determinant la infecció amb el virus Coxsackie B (Dotta et al, 2007). Aquest virus presenta una proteïna a la càpsida amb una alta homologia amb l'enzim àcid glutàmic descarboxilasa (AGD) present en la superfície de les cèl·lules β . Un cop la resposta immunitària ha eliminat al virus, segueix reaccionant contra l'enzim AGD de les cèl·lules β , de manera que es produeix una reacció autoimmunitària, que destrueix les cèl·lules β (Dotta et al, 2007; van der Werf et al, 2007). A més de la resposta immunitària contra la AGD, també s'ha descrit la presència d'anticossos contra la fosfatasa alcalina de les cèl·lules β , o fins i tot contra la pròpia insulina.

La DM tipus II se sol produir en etapes adultes de la vida i acostuma a estar relacionada amb obesitat, tot i que també es pot donar en persones primes d'edat molt avançada. Aquest tipus es caracteritza per ser un complex mecanisme fisiopatològic entre un dèficit relatiu de la producció d'insulina i una deficient utilització perifèrica d'aquesta per part dels teixits, l'hormona no pot facilitar l'entrada de la glucosa a l'interior de les cèl·lules. La DM tipus II és la forma més comuna i afecta al 90-95% de pacients diabètics. La predisposició genètica, la inactivitat, una dieta deficient i un elevat pes corporal augmenten significativament el risc de desenvolupar aquest tipus de diabetis (Talmud et al, 2010; Cooper et al, 2009). La hiperglucèmia és un procés gradual en la DM tipus II, en fases primerenques no sol ser tant severa i els pacients no tenen els símptomes clàssics de la malaltia, es per això que s'incrementa el risc de desenvolupar lesions micro o macrovasculars (DeFronzo et al, 2004).

2.2. EPIDEMIOLOGIA

La Federació internacional de diabetis (*International Diabetes Federation*, IDF), (www.idf.org) és l'organisme encarregat de publicar un anuari amb l'actualització de les dades epidemiològiques i preventives de la diabetis, *IDF Diabetes Atlas*. La DM és una epidèmia global i una de les malalties amb una major prevalença a nivell mundial. L'any 2012 hi havia 371 milions d'afectats (el 8,3% de la població adulta global) i es preveu que la xifra augmentarà fins a 552 milions l'any 2030 (el 9,9% dels adults), a més s'estima que uns 183 milions de persones pateixen la malaltia de forma subclínica o sense ser diagnosticats. La malaltia suposa una gran càrrega econòmica tant pels individus afectats com per la sanitat pública de cada país. L'any 2012 va causar 4,8 milions de morts (<http://www.idf.org/diabetesatlas>).

El nombre d'individus amb DM tipus II està augmentant ràpidament arreu del món. Aquest augment ve donat per l'augment dels recursos econòmics en els països en desenvolupament, l'envelliment de les poblacions, l'increment de la urbanització, els canvis en la dieta, la reducció de l'activitat física, així com una millora sanitària que contribueix a allargar la vida dels malalts de DM. La xifra global estimada de despeses sanitàries per prevenir i tractar la DM i les seves complicacions va ser de 471 bilions de dòlars l'any 2012 i s'estima que al 2030 serà de 654 bilions de dòlars (<http://www.idf.org/diabetesatlas/5e/foreword>).

2.3. SIMPTOMATOLOGIA I COMPLICACIONS A LLARG TERMINI

Com a resultat del desordre metabòlic, els pacients diabètics pateixen poliúria, polidípsia i polifàgia. Tot i això les complicacions sistèmiques severes ocorren amb el temps, provocant un detriment en la qualitat de vida dels pacients o inclús la mort i un elevat risc a patir infeccions. Hi ha una gran variabilitat en la progressió del curs de

la malaltia, la gravetat de les complicacions i l'òrgan o els òrgans afectats. La DM crònica està associada a diferents complicacions, inicialment, neuropatia perifèrica, microangiopatia (Fowler, 2008), retinopatia, nefropatia (Fowler, 2008; Deshpande et al, 2008), lipidosi hepàtica i hepatitis, i en fases avançades macroangiopatia (Fowler, 2008). La "síndrome del peu diabètic" són ferides que, degut a una mala irrigació sanguínia i a la degeneració nerviosa, no acaben de curar i que poden provocar laceracions i, eventualment, amputació de les extremitats inferiors (Boulton et al, 2005).

2.4. LA POLINEUROPATIA DIABÈTICA

La neuropatia diabètica (ND) es defineix segons l'ADA, com la presència de símptomes o signes de disfunció nerviosa perifèrica en pacients diabètics després d'haver exclòs altres causes (Boulton et al, 2005). L'ADA, classifica les ND en funció de la seva presentació clínica i progressió en: focals o multifocals i generalitzades simètriques. Les neuropaties focals o multifocals solen ser reversibles i inclouen mononeuropaties troncal, neuropaties cranials i neuropaties proximals motores. Les polineuropaties generals simètriques solen progressar i ser irreversibles, són les polineuropaties sensorimotors agudes i cròniques, i les polineuropaties autonòmiques (Sima, 2003). La polineuropatia sensorimotora crònica és la forma més comuna i és la que s'anomena polineuropatia diabètica (PND) (Vinik i Mehrabyan, 2004; Boulton et al, 2005).

La PND és una de les complicacions més freqüents de la DM (Sima, 2003), en la que, a causa de la hiperglucèmia, es produeix dany en els nervis perifèrics somàtics i autònoms (Tomlinson i Gardiner 2008). La hiperglucèmia crònica i les alteracions metabòliques que hi estan relacionades influeixen en la patogènia de les lesions de la fibra nerviosa i de la microvasculatura que acaben provocant la neuropatia (Vinik i Mehrabyan, 2004; Boulton et al, 2005).

La hiperglucèmia desencadena canvis metabòlics que afecten a certs components del sistema nerviós com els axons, les cèl·lules de Schwann, els nodes de Ranvier, la mielina (Mizisin et al, 2002) i els microvasos de l'endoneuri.

L'afectació de la fibra nerviosa es caracteritza per una degeneració progressiva i la incapacitat de regenerar (Sima, 2003; Bradley et al, 1995). Aquests canvis porten a un deteriorament de la funció nerviosa que cursa amb disfunció sensorial de les extremitats i dolor. Inicialment els signes són aguts i reversibles, fins que el quadre clínic esdevé progressiu, crònic i irreversible. El quadre clínic en humans cursa, en un inici, amb dolor i formigueig intermitent a les extremitats, principalment als peus, però a mesura que avança el temps de manera gradual, amb els anys, el dolor es fa més intens i constant. Aquest dolor neuropàtic pot arribar a provocar fatiga constant, depressió i pot ser una font d'ansietat, tot això disminueix significativament la qualitat de vida dels pacients. Als estadis finals s'acaba desenvolupant una neuropatia sense dolor. Quan es perd la sensació de dolor en determinades regions de les extremitats és quan incrementa el risc de lesió severa en els teixits, ja que la nocicepció no alerta als pacients de les lesions que pateixen. Aquests símptomes varien en funció del nervi o nervis afectats (Galer et al, 2000; Veves et al, 2008).

2.4.1. MECANISMES IMPLICATS EN LA DEGENERACIÓ NERVIOSA EN LA POLINEUROPATIA DIABÈTICA

Es desconeixen amb certesa els mecanismes patogènics que desencadenen la PND, està clar que es tracta d'un procés multifactorial. Hi ha varies hipòtesis per explicar-ho, com l'increment de l'activitat de la via del poliol, l'activació incorrecte de la proteïna cinasa C, l'auto-oxidació de la glucosa i un dèficit en el suport neurotròfic (Sugimoto et al, 2000; Sima, 2003; Vincent i Feldman, 2004; Tomlinson i Gardiner, 2008; Obrosova, 2008) (Fig8).

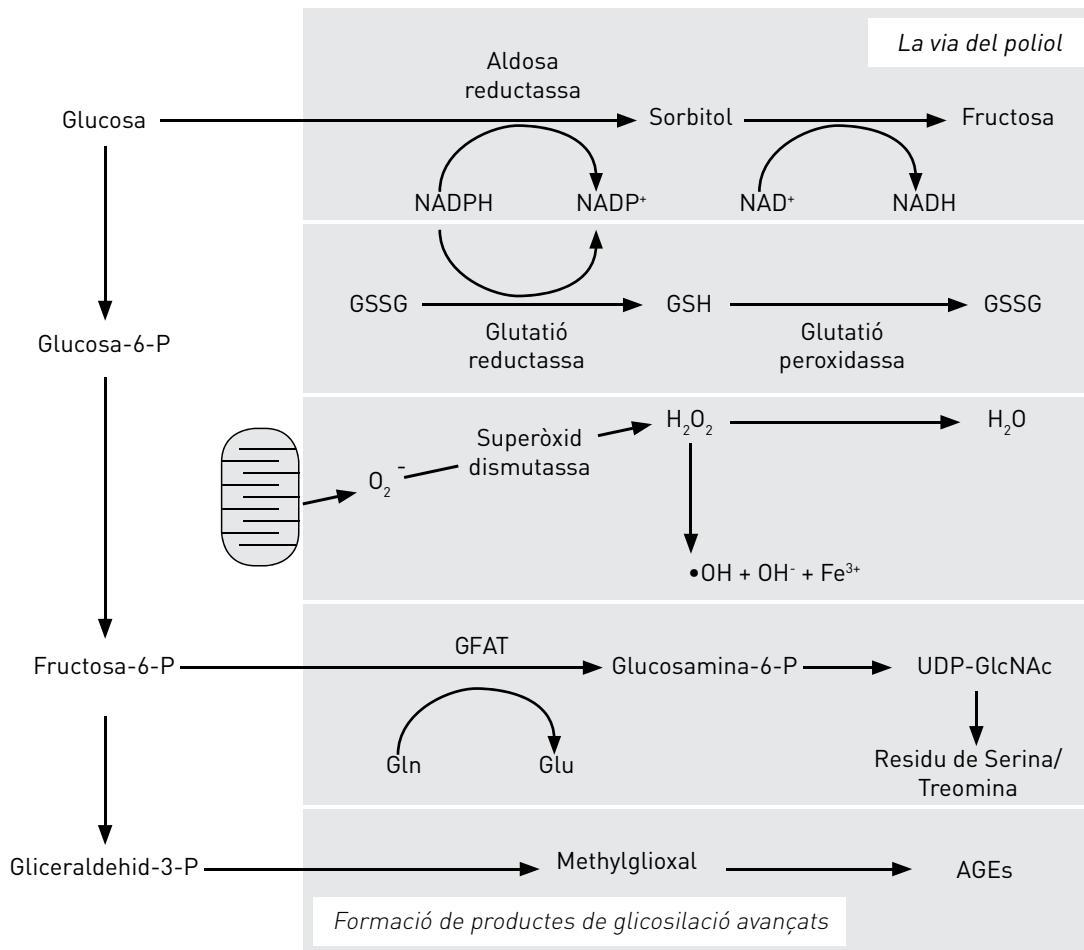


Figura 8. Esquema de les vies interrelacionades del metabolisme derivat de la glucosa en situacions d'hiperglucèmia. Adaptat de Tomlinson i Gardiner, 2008.

La via del polioli

En l'activació de la via del polioli l'enzim hexocinasa és l'encarregat de transformar la glucosa en glucosa-6-fosfat, però en condicions d'hiperglucèmia l'enzim està saturat i s'activa l'enzim aldosa reductasa (AR) tot i la seva baixa afinitat amb el substrat. L'AR catalitza la reacció de glucosa a sorbitol utilitzant el cofactor *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (NADPH). Les cèl·lules de Schwann expressen molta AR de manera que acumulen grans quantitats de sorbitol que provoquen dany cel·lular i tissular a les cèl·lules nervioses (Suzuki et al, 1999).

Una excessiva concentració de sorbitol provoca una disminució del mioinositol que causa una alteració en l'activitat $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPasa}$, essencial per a la conducció nerviosa. La sobreutilització de NADPH produeix un dèficit homeostàtic d'altres enzims que utilitzen el mateix coenzim, de manera que disminueixen els nivells d'òxid nítric i glutatió reduït i incrementa l'estrès oxidatiu, cosa que provoca també dany a les cèl·lules endotelials (Oka i Kato, 2001).

Acumulació d'espècies reactives d'oxigen

Quan hi ha un flux metabòlic normal les cèl·lules produeixen espècies reactives d'oxigen (ROS) a través de la cadena de transport d'electrons mitocondrials, i aquests són detoxificats per enzims com la glutatió peroxidasa, la catalasa i la superòxid dismutasa. En condicions d'hiperglucèmia la cèl·lula metabolitza més glucosa, de manera que es generen més radicals lliures i s'acumulen ROS que acaben alterant el potencial de membrana dels mitocondris i comprometen les funcions cel·lulars. Les neurones sensibles dels GAD es veuen especialment afectades (Lenninger et al, 2006; Vincent et al, 2007). En aquestes condicions s'activa l'enzim nuclear poli-ADP-ribose polimerasa (PARP) implicat en la mort cel·lular (Obrosova et al, 2004; Obrosova et al, 2005; Pacher et al, 2005; Szabo, 2005; Pacher i Szabo, 2005).

Activació incorrecte de la PKC

La proteïna cinasa C (PKC) és activada pel cofactor diacilglicerol (DAG). El nivell intracel·lular de DAG augmenta en situacions hiperglucèmiques o si hi ha alteracions en les concentracions de Ca^{2+} . La PKC participa en gran varietat de funcions com la transducció de senyals, la regulació de canals iònics o l'alliberament de neurotransmissors, controla el creixement i la diferenciació cel·lular, i canvis en la morfologia cel·lular (Yasuda et al, 2003). En el SNP s'ha descrit que la PKC juga un rol important en la fosforilació necessària per l'elongació del con de creixement (Yasuda et al, 2003). Diversos autors coincideixen en que la PKC també provoca hiperalgèsia en els models murins de neuropatia diabètica (Shangguan et al, 2003; Yamagishi et al, 2003; Uehara et al, 2004; Sluka i Audette, 2006).

L'auto-oxidació de la glucosa

En situacions d'hiperglucèmia també es dona la glicosilació no enzimàtica de glicoproteïnes formant productes de glicosilació avançats (AGEs) (Wada i Yagihashi, 2005). Aquests productes, al interaccionar amb els seus receptors (RAGE) modifiquen proteïnes intracel·lulars involucrades en la transcripció genètica i provoquen dany cel·lular, alteren la producció de citocines inflamatòries i de factors de creixement (Sugimoto et al, 2000; Huijberts et al, 2008; Lukic et al, 2008; Toth et al, 2008) (Fig9).

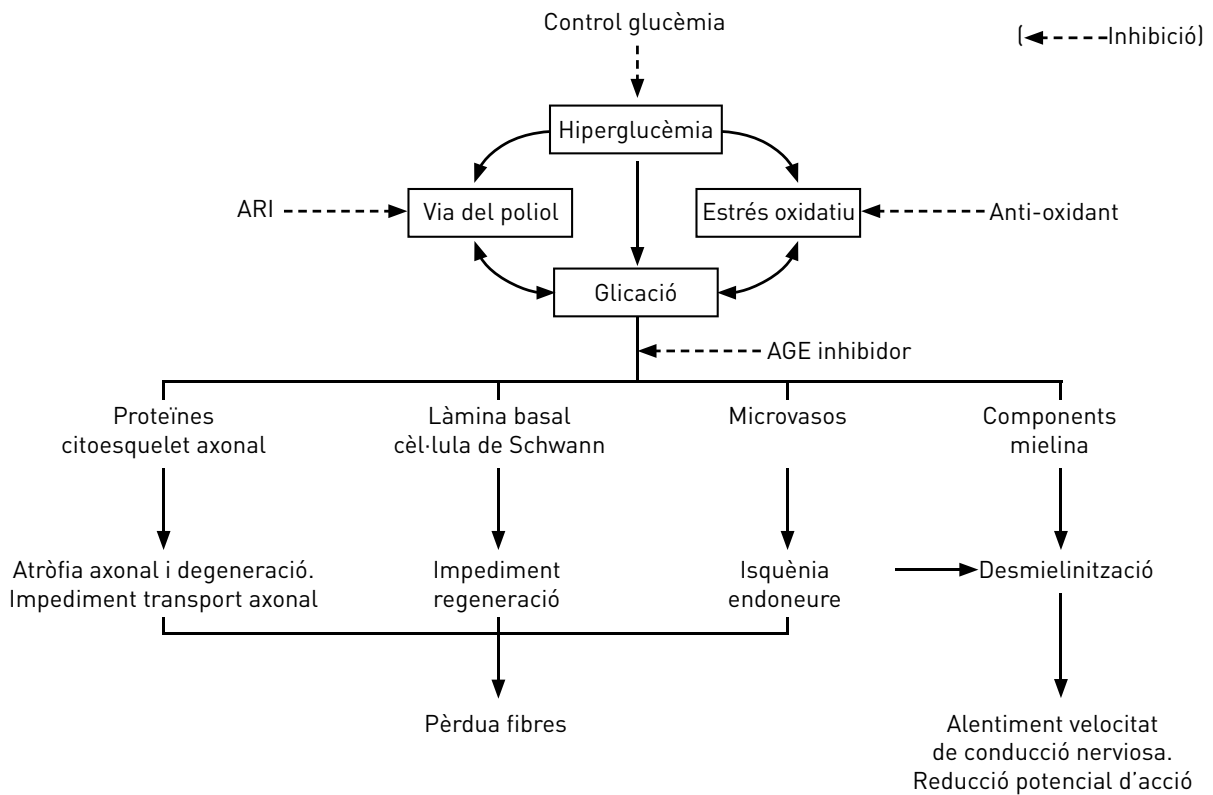


Figura 9. Mecanismes patogènics relacionats amb la glicació no-enzimàtica, que afecta als components de la mielina i a les proteïnes del citoesquelet axonal provocant la degeneració axonal i la desmielinització en la PND. Adaptat de Sugimoto et al, 2000.

La glicació de les glicoproteïnes estructurals de la matriu extracel·lular provoca engruiximent de la lamina basal dels endotelis dels capil·lars de l'endoneuri i de cèl·lules de Schwann, cosa que redueix la difusió de nutrients i oxigen, així com el contacte entre l'axó i la cèl·lula de Schwann (Bradley et al, 2000; Hill, 2009). La glicació de les proteïnes del citoesquelet, com la tubulina, els neurofilaments i l'actina, contribueix a una atròfia axonal i alenteix el transport axonal (Sugimoto et al, 2008).

Alteracions en els factors neurotròfics

Les neurones i les cèl·lules glials requereixen factors tròfics (Hill, 2009), aquests són proteïnes que regulen la supervivència, el creixement, la plasticitat morfològica i la síntesi de proteïnes que permeten les diferents funcions neuronals (Yasuda et al, 2003).

En la PND, s'altera el suport neurotròfic involucrant a diverses proteïnes com neurotrofines, *insulin-like growth factors* (IGF), *ciliary neurotrophic factor*, *glial derived neurotrophic factor*, neurturina i persefina, que tenen un paper important en el desenvolupament i progressió de la PND (Apfel, 1999; Lenninger et al, 2004). Tot i que es desconeixen els mecanismes que relacionen la PND amb les alteracions dels factors neurotròfics, sembla que l'estrès oxidatiu pot ser un factor que hi contribueix de manera important (Tomlinson i Gardiner, 2008). S'ha descrit que el tractament amb el factor neurotròfic *brain-derived growth factor* (BDNF) prevé o reverteix algunes alteracions estructurals o funcionals relacionades amb la PND en models experimentals (Mizisin et al, 1997).

El complex IGF està format per IGF-1, IGF-2, insulina, i les proteïnes que s'uneixen a IGF. Una de les seves funcions en el SN és afavorir la diferenciació i regular la supervivència tant de les neurones com de les cèl·lules de Schwann i neuronal (Morrione et al 2000; Zheng et al, 2002). També

s'ha descrit que promou la regeneració en cultius de neurones sensorials i estimula el creixement neurític (Rind i von Bartheld, 2002), també promou el desenvolupament d'oligodendròcits (Jiang et al, 2001) i estimula la mielinització del SNP (Cheng et al, 1999). La sobreexpressió d'IGF-1 en neurones sensorials i motores millora la velocitat de conducció nerviosa i la capacitat de regeneració nerviosa en animals diabètics (Homs et al, 2011).

2.4.2. LESIONS EN LA POLINEUROPATIA DIABÈTICA

En situacions d'hiperglucèmia la barrera sang-nervi queda alterada, cosa que provoca hipòxia i isquèmia en el teixit nerviós, atrofia axonal, desmielinització, pèrdua de fibres i degeneració de fibres nervioses (Sima, 2003; Yasuda et al, 2003). Les cèl·lules de Schwann i la seva làmina basal, que serveixen com a guia pel con de creixement axonal en la regeneració nerviosa, poden quedar danyats pels AGEs. Dipòsits d'AGEs en els microvasos de l'endoneuri poden provocar canvis vasculars (Sugimoto et al, 2000) (Fig9).

En la PND, en els GAD s'observa canvis en el pericarió i mort per apoptosi de les neurones sensibles. Les cèl·lules es troben fora de la protecció de la barrera sang-nervi i, per tant, estan sotmeses als canvis osmòtics, de pH i a les altes concentracions de glucosa. L'apoptosi juga un paper important en la degeneració i pèrdua de neurones dels GAD observada en la PND (Kamiya et al, 2005; Edwards et al, 2010; Kamboj et al 2010). A més, a la matriu extracel·lular (MEC) dels GAD hi ha un dipòsit aberrant del col·lagen, canvis en els tipus del col·lagen que es diposita i un increment en el diàmetre de les fibril·les (Peltonen et al, 1997; Bradley et al, 2000). També hi ha un dèficit en els receptors de les molècules d'adhesió que impedeix una correcta adhesió de les neurones a la MEC (Sango et al, 1999; Sima, 2003; Oztürk et al, 2006).

2.4.3. POLINEUROPATIA DIABÈTICA I REGENERACIÓ NERVIOSA

En els animals diabètics, després de la degeneració axonal i la desmielinització, la recuperació es menor que en els no diabètics (Perkins et al, 2002; Vinik i Mehrabyan, 2004; Thomsen et al, 2009). Els animals amb PND pateixen un impediment en la regeneració del SNP després d'una lesió nerviosa com una axotomia o una lesió per aixafament (*crush*) (Kogawa et al, 2000). Hi ha un retràs en l'inici de la regeneració i una disminució tant del gruix de la mielina com del diàmetre de l'axó (Yasuda et al, 2003). Aquestes alteracions són causades pels defectes en el trencament de la mielina, per l'impediment en la resposta axonal retrògrada, per la disminució de la velocitat de regeneració i per la falta de maduració de les fibres nervioses que han estat capaces de regenerar-se (Yasuda et al, 1999; Kennedy i Zochodne, 2005).

Estudis *in vitro* de cultius cel·lulars de GAD de ratolins adults, demostren que els nivells moderats d'hiperglucèmia inhibeixen el creixement i la migració de les cèl·lules de Schwann i que nivells més elevats d'hiperglucèmia retarden el ritme de creixement de les neurites de les neurones (Gumy et al, 2008). També s'ha demostrat que en presència de laminina i diferents tipus de col·lagen glicats, hi ha una disminució del creixement axonal de les neurones i una reducció en la seva mobilitat (Oztürk et al, 2006).

En la degeneració i en els posteriors dèficits de la regeneració nerviosa que s'observen en la PND hi estan involucrats l'estrès cel·lular, la mort per apoptosi de les neurones dels ganglis dorsals i canvis en la matriu extracel·lular i en les molècules d'adhesió que afavoreixen el creixement i la migració de les cèl·lules, així com alteracions en factors de creixement (Yasuda et al, 2003).

La degeneració Walleriana és un prerequisit per una correcta regeneració nerviosa, però en processos de PND aquesta es produeix de manera incorrecte i alentida, hi ha degeneració i desintegració granular de l'axó i els neurofilaments estan fosforilats pel que són més resistents a la degradació (Pant et al, 1988). Els macròfags a causa del defecte vascular i la isquèmia arriben més tard al lloc de la lesió i triguen més a alliberar citocines i fagocitar les restes cel·lulars (Sima et al, 1997; Kennedy i Zochodne, 2000; Chen et al, 2010).

En la DM, les anomalies metabòliques, com l'acumulació de sorbitol, alteren les cèl·lules de Schwann, i com a conseqüència aquestes no són eficients al moment d'elaborar molècules essencials pel creixement i la remielinització de l'axó (Apfel, 1999).

Les neurones sensibles també estan afectades i s'han descrit canvis en l'expressió gènica després d'una lesió nerviosa per aixafament en el model de rates amb diabetis espontània BB/Wor. Els GAD d'aquestes fallen en la infra o sobreexpressió de neurofilaments i proteïnes de síntesi, i també s'altera l'expressió del gen que codifica per la proteïna IGF-1 i el seu receptor (Xu et al, 2002).

Altres complicacions associades al creixement axonal són la disminució de l'eficàcia de proteïnes que formen part del con de creixement, la glicació de proteïnes de la MEC i de les molècules d'adhesió expressades per les cèl·lules de Schwann. Amb el temps hi ha una reducció significativa del nombre de fibres nervioses regenerades i un retràs en la seva maduració. Aquestes fibres tenen un inferior gruix de mielina, menor diàmetre de l'axó i minvada la capacitat de recuperació funcional del nervi (Terada et al, 1996; Kennedy i Zochodne, 2000).

3. MODELS ANIMALS PER A L'ESTUDI DE LA DIABETIS MELLITUS

Per a l'estudi dels factors que contribueixen al desenvolupament de la PND es fan servir diversos models tant *in vitro* com *in vivo*.

En els estudis *in vitro* se sol treballar amb cultius primaris de neurones de GAD, de cèl·lules de Schwann o de nervis perifèrics, amb l'objectiu de reproduir el que succeeix *in vivo*. Treballar amb cultius *in vitro* té l'avantatge que permet controlar els factors metabòlics que dificulten l'estudi d'una determinada variable *in vivo* (Hattangady i Rajadhyaksha, 2009). Ara bé, aquests tipus de tècniques no mimetitzen el curs clínic de la malaltia i són massa simples com per caracteritzar la complexitat de la ND. Per a l'estudi de la PND s'acostuma a treballar amb models animals *in vivo* que reproduïen amb més precisió les condicions clíniques de la malaltia. Existeixen diversos models animals que mimetitzen diferents aspectes clínics de la diabetis i que són utilitzats per estudiar la patogènia i els possibles tractaments, però cap d'ells reproduïx de forma completa la malaltia (Apfel, 2006).

Models *in vivo*

La PND s'ha estudiat en diverses espècies de mamífers, primats (Birrell et al, 2000), gossos (Sharma et al, 1995; Sugimoto et al, 1999), gats (Mizisin et al, 2007; Estrella et al, 2008) i rosegadors (Sullivan et al, 2007; Carozzi et al, 2010). Els rosegadors diabètics tenen biomarcadors de PND de funcionalitat, estructurals i moleculars similars als dels malalts humans amb neuropatia diabètica, però no hi ha un model únic que reproduïxi completament la diabetis humana (Apfel, 2006; Sullivan et al, 2007).

Els models animals de DM més utilitzats, segons la forma de desenvolupar la malaltia es poden agrupar en: espontanis, induïts per fàrmacs i transgènics.

3.1. MODELS DE DIABETIS ESPONTÀNIA

3.1.1. MODELS DE DIABETIS ESPONTÀNIA TIPUS I

- **Ratolí obès no diabètic (NOD):** Aquest model desenvolupa una infiltració leucocitària del pàncrees i una destrucció immunomediada de les cèl·lules β entre les 4 i 6 setmanes de vida, fet que desencadena un procés diabètic de tipus I abans de les 12 setmanes d'edat (Rees i Alcolado, 2005). Les femelles són més susceptibles, sobretot les gestants, arribant a afectar un 90% dels animals. La taxa d'afectació dels mascles és molt variable i oscil·la entre un 40 i un 70%. Els animals s'han de mantenir en condicions lliures de patògens específics per que desenvolupin la diabetis, de manera que, per exemple, no és possible estudiar fets com la implicació dels virus en l'aparició de la malaltia (Atkinson i Leiter et al, 1999). És difícil predir a quina edat exacta desenvoluparan la malaltia i, un cop la desenvolupen, s'han de tractar amb insulina a diari. Els animals presenten anomalies electrofisiològiques, i en el SNP s'observa infiltració mononuclear, desmielinització (Bour-Jordan et al, 2005) i un retràs en la regeneració després d'una lesió nerviosa per aixafament (Homs et al, 2011). També es considera un bon model per a l'estudi de la PN del SNA com la gastroenteropatia diabètica o la neuropatia cardiovascular (Gross et al, 2008).
- **Rata *BioBreeding Worcester* (BB/Wor):** Aquest model pateix una destrucció immunomediada de les cèl·lules β del pàncrees, que desencadena l'aparició espontània d'hiperglucèmia i hipoinsulinèmia. La DM tipus I es detecta al voltant de les 10-12 setmanes d'edat (Sima, 2003; Sigaudou-Roussel et al, 2007). Les

primeres alteracions electrofisiològiques es detecten aproximadament a la 5a setmana després de la instauració de la malaltia i van empitjorant durant els 4 mesos següents. Hi ha atròfia axonal i degeneració Walleriana de les fibres mielíniques i no-mielíniques, i una disminució de la regeneració nerviosa que provoca una pèrdua de fibres (Kamijo et al, 1996). Als 6 mesos de malaltia els animals mostren hiperalgèsia i pèrdua de les fibres nervioses intraepidèrmiques (Sima i Kamiya, 2006). Aquest model és interessant pels canvis estructurals a nivell del SNP, però té l'inconvenient de que també necessiten una dosi diària d'insulina com a tractament (Sima, 2003).

3.1.2. MODELS DE DIABETIS ESPONTÀNIA TIPUS II

- **Ratolins obesos db/db:** Tenen una mutació autosòmica recessiva en el gen que codifica pel receptor de la leptina. La leptina és una hormona que té un paper important en la sensació de sacietat, de manera que aquests animals tenen polifàgia, són obesos i pateixen DM tipus II al voltant de les 12 setmanes d'edat. Desenvolupen una resistència a la insulina i, per tant, hiperinsulinèmia amb la conseqüent hiperglucèmia i hiperplàsia de les cèl·lules β dels illots pancreàtics. Cap als 6 mesos d'edat, una de les primeres alteracions que es detecta és una disminució de la velocitat de conducció nerviosa, sobretot afectant als nervis motors (Robertson i Sima, 1980); un engruiximent dels microvasos del endoneuri, una disminució de les fibres nervioses intraepidèrmiques (Underwod et al, 2001; Gibran et al, 2002) i una lleugera atròfia axonal sense afectar a les fibres mielíniques. El gran inconvenient d'aquest model és que moren al voltant dels 8-10 mesos d'edat degut a complicacions secundàries com cetoacidosi o pèrdua progressiva de pes, i no serveixen per estudiar estadis avançats de la malaltia (Rees i Alcolado, 2005; Srinivasan i Ramarao, 2007).

- **Ratolins obesos ob/ob:** Tenen una mutació autosòmica recessiva en el gen de la leptina, de manera que en produeixen menys i desenvolupen obesitat, resistència a la insulina i hiperglucèmia (Rees i Alcolado, 2005). Aquests animals pateixen una destrucció de les cèl·lules β pancreàtiques. Tenen un fenotip bastant similar als db/db, però pateixen un procés diabètic més sever, que s'inicia una mica abans i les lesions de la neuropatia són més extenses. Mostren una disminució de la velocitat de conducció nerviosa, amb afectació de les fibres mielíniques (fenòmens de desmielinització i remielinització) i degeneració Walleriana. El gran inconvenient d'aquest model són les complicacions secundaries del procés diabètic (Drel et al, 2006).
- **Rates Zucker:** Presenten un defecte en el gen del receptor de la leptina, tenen inhibida la secreció d'insulina i desenvolupen un procés diabètic. Tenen infrarregulació del transportador de glucosa 2 (GLUT-2) a les cèl·lules β pancreàtiques i del GLUT-4 a teixit adipós i múscul (Srinivasan i Ramarao, 2007). La disfunció neuronal d'aquest model es comença a detectar aproximadament a les 8 setmanes d'edat i es caracteritza per una hiperalgèsia tant tèrmica com mecànica, reducció de la velocitat de conducció nerviosa i alteracions vasculars (Coopey et al, 2002; Li et al, 2006). Amb el temps apareixen més complicacions com hipoalgèsia i pèrdua de terminacions nervioses amielíniques intraepidèrmiques (Li et al, 2006; Brussee et al, 2008). L'inconvenient d'aquest model és que no presenten una pèrdua evident de fibres nervioses mielinitzades (Li et al, 2006; Brussee et al, 2008), a més a més de que també desenvolupen anomalies hipotalàmiques i neuroendocrines que deriven en una disminució de la fertilitat (Dryden et al, 1995).

3.2. MODELS INDUÏTS PER FÀRMACS

- **Ratolí tractats amb estreptozotocina:** L'estreptozotocina (STZ) és un antibiòtic derivat de *Streptomyces achromogenes*. És el fàrmac diabetogènic més utilitzat per induir la DM i per al posterior estudi de la PND. És una molècula tòxica que es considera anàloga a la glucosa, i mitjançant el GLUT2 s'acumula a les cèl·lules β pancreàtiques, on provoca necrosi cel·lular (Lenzen, 2008).

Una sola dosi alta de STZ té un efecte citotòxic sobre les cèl·lules β pancreàtiques i provoca necrosi en 1-2 dies. La millor manera de mimetitzar la DM tipus I és l'administració de la STZ a dosis baixes (30mg/kg de pes viu) en múltiples petites dosis repetides, via intraperitoneal, durant 5 dies consecutius. Això porta a la destrucció immunomediada de les cèl·lules β (Szkudelski, 2001; Lenzen, 2008).

Una setmana després de la inducció de la diabetis aquests animals ja presenten anomalies vasculars. A les 6-9 setmanes de diabetis presenten hipoalgèsia, pèrdua de fibres nervioses intraepidèrmiques i alteracions electrofisiològiques. Als 9 mesos aquestes alteracions són més severes mostrant atrofia axonal, disminució del gruix de la mielina, reducció de la innervació a les glàndules sudorípares i alteracions en les neurones sensibles (Pittenger i Vinik, 2003). El principal inconvenient d'aquest model és l'efecte tòxic de la STZ. S'han descrit canvis hepàtics com peroxidació lipídica, tumefacció dels mitocondris i inhibició de la proliferació dels hepatòcits (Kume et al, 2004) i un possible efecte neurotòxic de la STZ (Pabbidi et al, 2008).

3.3. MODELS MIXTES TRANSGÈNICS QUE EXPRESSEN INF β A LES CÈL·LULES PANCREÀTIQUES TRACTATS AMB STZ

Hi ha models transgènics de diabetis als que s'hi han introduït gens que s'expressen a les cèl·lules β del pàncrees, com per exemple l'interferó β (INF β). L'INF β és citotòxic per les cèl·lules β pancreàtiques, fins a destruir-les, de manera que no es produeix insulina i es provoca un procés diabètic (Salavert, 2003).

Per profunditzar més en el paper que juga l'INF β en la inducció de la DM, en el Centre de Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica (CBATEG) de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), es va crear un model de ratolí transgènic que expressava INF β humà sota el control del promotor d'insulina de rata (RIP) (Pelegrin et al, 1998). Aquest model transgènic RIP/INF β amb un fons genètic CD1 mostra característiques d'un estat prediabètic, és a dir, hi ha una inhibició de la secreció de insulina induïda per la glucosa. El pàncrees presenta infiltració limfocitària en els illots de Langerhans i disminució de l'alliberació d'insulina en situacions hiperglucèmies. El 9% acaben desenvolupant DM de manera espontània. Com a conseqüència, aquests animals presenten hiperglucèmia moderada, hipoinsulinèmia, hipertriglicèridèmia i alteració de la prova de la tolerància a la glucosa (Salavert, 2003).

S'ha demostrat que a dosis baixes de STZ (5 dosis de 30mg/kg/dia) el 50% dels ratolins RIP/INF β presenten un procés que mimetiza la diabetis autoimmune humana, nivells de glucosa en sang similars als dels animals amb DM, infiltració limfocítica al pàncrees i destrucció de les cèl·lules β (Devedjian et al, 2000). Quinze dies després del tractament tenen nivells de glucosa en sang superiors a 250 mg/dl. La diabetis que s'instaura en aquests animals és de curs lent, de manera que al cap de 3 a 5 mesos els animals són diabètics i mostren valors de glucèmia superiors 600 mg/dl en sang (Salavert, 2003). Aquests resultats indiquen

que l'expressió de l'INF β en les cèl·lules β pancreàtiques potencia l'efecte tòxic de l'STZ i condueix a un procés inflamatori contra les cèl·lules β que acaba desencadenant DM tipus I (Casellas et al, 2006). En canvi, en els animals control la mateixa dosi de STZ no provoca canvis en els nivells de glucosa o en l'arquitectura dels illots pancreàtics.

Estudis previs realitzats en el nostre grup demostren que aquest model transgènic RIP/INF β amb un fons genètic ICR, tractat a dosis baixes de STZ (30 mg/kg) desenvolupa signes de neuropatia diabètica del sistema nerviós entèric (Domènech et al, 2011). Aquest model també mostra evidències de regeneració nerviosa posttraumàtica mitjançant estudis electrofisiològics i morfològics a les 4 setmanes després d'una lesió nerviosa per aixafament del nervi ciàtic (Serafin et al, 2010) i alteracions electrofisiològiques dels nervis perifèrics als 3 mesos després d'haver-se establert la DM (Molín, 2011). Es considera doncs que aquest model transgènic mimetitzava els estadis inicials de la PND en humans.

4. EXPRESSIÓ GÈNICA

En els darrers anys s'han desenvolupat tècniques que permeten l'estudi del DNA i dels seus transcrits, fet que ha permès canviar l'enfoc de l'estudi de les malalties.

L'expressió dels gens d'una cèl·lula varia en funció dels processos cel·lulars que estiguin activats i varien tant en situacions fisiològiques com patològiques (Kume et al, 2005; Courtney et al, 2010). En l'estudi de les malalties, el coneixement dels canvis d'expressió gènica en una cèl·lula aporta informació valuosa sobre la patogènia i/o mecanismes de resposta de l'hoste davant la presència d'un procés metabòlic alterat i el desenvolupament de la malaltia (Courtney et al, 2010).

Els mètodes d'anàlisi de l'expressió gènica poden ser d'anàlisi massius o *high throughput* o d'anàlisi no massius. Amb els mètodes massius es fa un escaneig general del patró de l'expressió gènica d'un individu, avaluant un gran nombre de gens. Per contra amb els mètodes no massius s'analitza el comportament d'un gen determinat. En el cas de l'estudi dels canvis en l'expressió gènica en la PND resulta més eficaç un anàlisi massiu, per tal de tenir una bona idea de quines són les rutes alterades.

Els resultats obtinguts en aquests tipus d'anàlisi s'han de confirmar amb altres tècniques que permetin quantificar els nivells d'expressió gènica, habitualment s'utilitza la tècnica *polymerase chain reaction* quantitativa en temps real (RT-qPCR), i així veure en quina mesura els canvis observats en l'expressió gènica es tradueixen en canvis biològics funcionals i determinar la seva importància (Geschwind, 2003).

4.1. ANÀLISI MASSIU DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA

Entre els anàlisi massius, els *microarrays* és una de les tècniques més emprades. Els *microarrays* són una col·lecció ordenada de punts, on cada punt conté una determinada seqüència d'àcid nucleic (sonda) immobilitzada sobre una matriu (Gabig i Wegrzyn, 2001; Maughan et al, 2001). El suport més utilitzat per fixar les sondes és el vidre ja que es tracta d'un suport no porós que permet l'enllaç covalent amb les sondes i dona un soroll de fons o background baix a l'hora de llegir el microarray (Maughan et al, 2001).

L'avantatge d'aquests tipus d'anàlisis és que permeten quantificar elevats nombres de transcrits simultàniament a un cost relativament assequible (Courtney et al, 2010). La gran quantitat d'informació que generen fa necessari l'ús de tècniques bioinformàtiques per tal de poder discernir quina informació és significativa i rellevant i descartar-ne la resta (Dudoit et al, 2003; Rhee et al, 2008). El maneig estàndard de les dades resultants dels *arrays* inclou una inspecció visual de les imatges dels *arrays*, un preprocessament de les dades (aplicació de filtres i normalització de dades), la selecció dels gens segons el seu nivell d'expressió, la identificació de patrons d'expressió i la classificació dels resultats en grups funcionals (Rhee et al, 2008).

Els inconvenients que tenen són que el desenvolupament dels *microarrays* depèn del nivell de coneixement de la seqüència del genoma de l'espècie a la qual està enfocada; que al basar-se en reaccions d'hibridació, fa que les hibridacions inespecífiques disminueixin la seva especificitat; i que tenen un rang dinàmic limitat que dificulta la detecció de canvis d'expressió relativament petits (Wang et al, 2009). Per altra banda, les diferències existents entre les empreses que produeixen els arrays dificulten la comparació de resultats obtinguts en diferents treballs (Li et al, 2009) i que el maneig de les dades resultants requereix coneixements i experiència en bioinformàtica (Dudoit et al, 2003; Gentleman et al, 2005).

Aquestes tècniques de *microarrays* es poden utilitzar amb diferents finalitats com l'anàlisi comparatiu de l'expressió entre dos organismes, la valoració de nivells de transcrits o l'anàlisi de variacions del DNA entre altres (Geschwind, 2003).

Es diferencien dos tipus de *microarrays*, els *microarrays* de cDNA i els *microarrays* d'oligonucleòtids.

4.1.1. ELS MICROARRAYS DE cDNA

En els *microarrays* de cDNA, les sondes fixades en el suport sòlid són cadenes complementàries de DNA (cDNAs) de mida llarga (més de 100 parells de bases) (Gabig i Wegrzyn, 2001). Aquests cDNAs són clons de DNA o amplificacions per PCR de seqüències de DNA extretes de bases de dades o incloses a l'atzar (Maughan et al, 2001; Geschwind, 2003; Courtney et al, 2010). Equips de precisió automatitzats dipositen les sondes de fins a 40.000 gens en el suport comercial utilitzat generalment de vidre (Maughan et al, 2001).

La mostra problema consisteix en una solució d'àcids nucleics d'un individu que es marcarà amb nucleòtids radioactius o fluorescents (Courtney et al, 2010) en funció del suport utilitzat abans de ser hibridada amb les sondes fixes a la matriu.

Aquests *microarrays* o xips de DNA, en comparació amb els oligonucleòtids, tenen un temps de vida curt (Gabig i Wegrzyn, 2001).

4.1.2. ELS MICROARRAYS D'OLIGONUCLEÒTIDS

Les sondes d'oligonucleòtids poden ser de dos tipus: sondes presintetitzades i fixades sobre el suport sòlid de manera similar als cDNAs o sondes sintetitzades *in situ* sobre la mateixa matriu del *microarray* (Gabig i Wegrzyn, 2001; Courtney et al, 2010). Els oligonucleòtids

presintetitzats són d'aproximadament 60-70 parells de bases, mentre que els sintetitzats in situ són generalment més curts, de 25 parells de bases (Gabig i Wegrzyn, 2001; Geschwind, 2003). Els fabricants comercials més importants de *microarrays* d'oligonucleòtids són *Affymetrix*® i *Illumina*®.

L'alta densitat de sondes d'oligonucleòtids a la que es pot arribar, pot acabar sent un inconvenient, ja que augmenta la probabilitat d'hibridacions creuades entre les pròpies sondes (Maughan et al, 2001). Tot i així, l'evolució de la tecnologia ha permès minimitzar els problemes originals i incrementar la fiabilitat dels resultats (Courtney et al, 2010).

El nivell d'expressió dels gens es determina en funció del valor *Fold Change* (FC). El FC és el valor que pren la nostra condició d'interès en funció d'un valor inicial que es pren com a referència, anomenat *baseline*.

4.2. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA EN NEUROPATIES

S'han estudiat diferents malalties del SN amb la tècnica de *microarrays* com per exemple, canvis en l'expressió gènica de neurones de la medulla espinal (Ledoux et al, 2006; Swanberg et al, 2006) i dels GAD (Price et al, 2004), en les cèl·lules de Schwann i els fibroblasts del nervi ciàtic (Ara et al, 2004).

En models murins sotmesos a axotomia o lesions per aixafament del nervi ciàtic en la primera etapa de la lesió, que correspon a la degeneració nerviosa, s'ha observat que hi ha un increment dels gens relacionats amb la inflamació (Costignan et al, 2002), apoptosi i mort cel·lular (Yang et al, 2006). Un cop es comença a produir la regeneració nerviosa, s'ha descrit que s'activen les vies relacionades en reorganització cel·lular (Costignan et al, 2002), creixement axonal i factors de creixement de fibroblasts (Bonilla et al, 2002; Tanabe et al, 2003; Ara et al, 2004).

També s'ha descrit l'activació de BDNF, interleucina 6, galanina (Gal) i que les cèl·lules satèl·lit produeixen *nerve growth factor* (NGF) (Nilsson et al, 2005). S'ha observat l'activació de gens relacionats amb vies de senyalització acoblades de receptors de proteïnes G, transport de sodi i potassi, percepció sensorial i receptors de superfície cel·lulars lligats a transducció de senyals (LeDoux et al, 2006); gens relacionats amb la reorganització de components cel·lulars o la disminució de l'expressió de gens relacionats amb processos de neurotransmissió (Costignan et al, 2002).

Els estudis portats a terme sobre la PND han estat realitzats en rates diabètiques. Aquests estudis estan centrats en l'estrès oxidatiu (Price et al, 2004), en la matriu extracel·lular en processos apoptòtics (Burnand et al, 2004) i en vies de senyalització o suport neurotròfic (Karamoysoyli et al, 2008).

Hi ha escassos estudis d'expressió gènica d'anàlisi massiu en models murins de PND. Realitzar aquests estudis permetrà conèixer els processos biològics més representatius que estan implicats en la degeneració nerviosa i la capacitat de regeneració després d'una lesió traumàtica en la diabetis

III. OBJECTIUS

Una de les complicacions més freqüent de la diabetis és la polineuropatia. Els ratolins transgènics RIP/INF β tractats amb dosis baixes i consecutives de STZ (Tg-STZ) són un bon model de neuropatia diabètica. Aquests animals diabètics, 4 setmanes després d'haver patit una lesió per aixafament del nervi ciàtic encara mostren signes electrofisiològics i canvis morfològics indicatius de regeneració nerviosa. Els processos biològics implicats en la reparació de lesions dels nervis perifèrics estan sota control de ganglis de les arrels nervioses.

Per aquesta raó, és possible que analitzant i comparant l'expressió gènica dels GAD del nervi ciàtic, lesionat i no lesionat, de ratolins ICR control i del model transgènic de diabetis (Tg-STZ), es pugui determinar quin paper juga la diabetis en la degeneració i regeneració nerviosa post traumàtica.

Objectius

1. Analitzar l'expressió gènica dels GAD del nervi ciàtic, lesionat i no lesionat, de ratolins controls ICR i transgènics Tg-STZ i seleccionar els gens amb expressió diferencial significativa.
2. Identificar processos biològics implicats en la degeneració i regeneració nerviosa 4 setmanes després d'una lesió traumàtica, i el paper que hi juga la diabetis.
 - 2.1. Detectar canvis deguts a un possible efecte tòxic de la STZ
 - 2.2. Identificar processos de regeneració posttraumàtica del nervi ciàtic en animals sans
 - 2.3. Identificar processos de degeneració del nervi ciàtic no lesionat en animals diabètics
 - 2.4. Identificar processos de regeneració posttraumàtica del nervi ciàtic en animals diabètics

Per assolir aquests objectius, un cop fet l'anàlisi de l'expressió gènica, es van realitzar comparacions dels perfils gènics entre les diferents condicions experimentals:

ICR-STZ lesionades vs ICR lesionades

per detectar canvis deguts a un possible efecte tòxic de la STZ.

ICR lesionades vs ICR no lesionades

per identificar processos de regeneració posttraumàtica del nervi ciàtic en animals sans.

Tg-STZ no lesionades vs ICR no lesionades

per identificar processos de degeneració del nervi ciàtic no lesionat en animals diabètics.

Tg-STZ lesionades vs ICR lesionades

per identificar processos de regeneració posttraumàtica del nervi ciàtic en animals diabètics.

IV. MATERIAL I MÈTODES

1. ANIMALS

En aquest estudi es van utilitzar ratolins transgènics RIP/INF β que expressen el gen quimèric RIP/INF β en les cèl·lules β pancreàtiques. Els ratolins transgènics procedien de colònies prèviament establertes i caracteritzades en el Centre de Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica de la Universitat Autònoma de Barcelona (CBATEG-UAB). Aquests animals s'havien generat a partir d'híbrids C57BL6/SJL (*The Jackson Laboratory Bar Harbor*, Maine, USA) (George et al, 2002) i posteriorment es van retrocreuar amb ratolins de la soca ICR fins arribar a la generació F5 (Pelegri et al, 1998).

Com a animals control del transgen es van utilitzar ratolins Hsd:ICR (CD-1®), subministrat per *Harlan Laboratories* (Indianapolis, IN, USA), ja que els animals transgènics tenien fons genètic ICR.

Es va treballar amb ratolins mascles d'entre 8 i 10 setmanes d'edat. Els animals es van mantenir en condicions de temperatura i llum controlada (12 hores de llum i 12 hores de foscor) i van ser alimentats de forma rutinària amb una dieta estàndard de laboratori, *2018S Teklad Global* (Panlab, Barcelona).

Els animals van ser manipulats d'acord amb la legislació vigent i amb l'aprovació del Comitè d'Ètica i d'Experimentació Animal i Humana de la UAB, codi CEAAH 00573, CEAAH 00650 i CEAAH 00599.

1.1. GRUPS D'ANIMALS

Es van utilitzar 120 animals controls ICR i 120 animals transgènics RIP/INF β amb background ICR.

Els grups experimentals establerts van ser:

- Grup 1. **ICR**: 60 animals controls ICR tractats amb vehicle (tampó citrat)
- Grup 2. **ICR-STZ**: 60 animals controls ICR tractats amb STZ
- Grup 3. **Tg**: 60 animals transgènics RIP/INF β tractats amb vehicle (tampó citrat)
- Grup 4. **Tg-STZ**: 60 animals transgènics (RIP/INF β) tractats amb STZ

El Grup 1 (ICR) es va utilitzar com a grup control del transgen, i als animals sols se'ls hi va administrar tampó citrat.

El Grup 2 (ICR-STZ) va ser tractat amb STZ per a comprovar possibles efectes tòxics de la STZ i avaluar si aquests animals no transgènics podien desenvolupar DM amb dosis baixes repetides de STZ.

El Grup 3 (Tg) es va utilitzar com a grup control del possible efecte tòxic de la STZ en els animals transgènics, i als animals sols se'ls va tractar amb tampó citrat

El Grup 4 (Tg-STZ) corresponia als animals transgènics tractats amb dosis baixes repetides de STZ per a que desenvolupessin DM.

1.2. PROCEDIMENT EXPERIMENTAL

El desenvolupament temporal de l'experiment va ser el següent (Fig1):

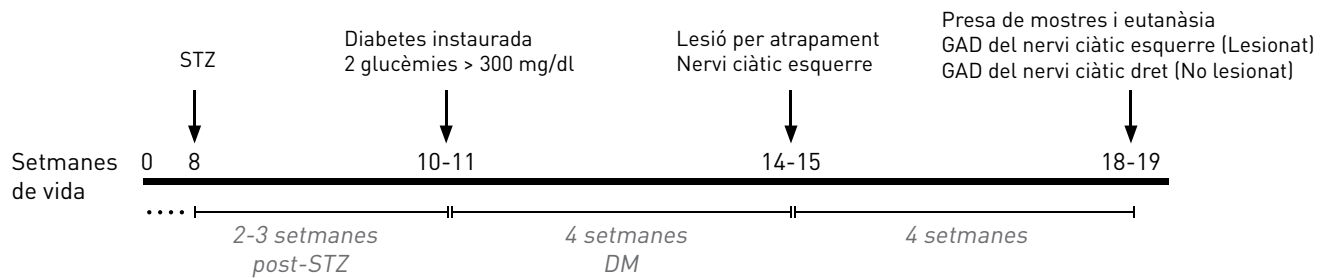


Figura 1.
Esquema del procediment experimental.

1.2.1. INDUCCIÓ DE LA DIABETIS EXPERIMENTAL MITJANÇANT STZ

A les 8 setmanes de vida es va iniciar el tractament, amb STZ o vehicle, que es va realitzar mitjançant injecció intraperitoneal sense anestèsia.

La dosi de STZ administrada va ser de 30mg/kg. La STZ es va dissoldre en una solució de citrat sòdic 10mM amb 0.9% NaCl, pH 4.5, immediatament abans de la seva administració. Els grups ICR-STZ i Tg-STZ, per induir la DM, van rebre 5 dosis de STZ, durant 5 dies consecutius.

El volum total de tampó citrat administrat va ser de 0,2-0,3 ml de una solució de citrat sòdic 10mM amb 0.9% NaCl, pH 4.5. Els grups ICR i Tg van rebre 5 dosis de tampó citrat, durant 5 dies consecutius.

1.2.2. DETERMINACIÓ DEL PES CORPORAL DELS ANIMALS I DE LA GLUCOSA EN SANG

Per tal de valorar i monitoritzar el desenvolupament de la DM es varen estudiar dos paràmetres, l'evolució del pes corporal i els nivells de glucèmia.

- **Pes corporal:** el pes es va mesurar en una balança *Ohaus Adventurer Pro* (OHAUS Corporation, Parsippany, NJ, USA).
- **Glucosa en sang:** es varen extraure 20 Ql de sang per la vena caudal de la cua mitjançant un tall a l'extrem de la cua. Els nivells de glucosa en sang es van determinar amb un Glucòmetre *Elite Analyzer* (Bayer, Leverkusen, Alemanya).

Aquest procediment es va realitzar cada 15 dies. Es va considerar que un grup s'havia tornat diabètic després de 2 mesures consecutives de glucèmia superiors a 300mg/dl. El grup Tg-STZ va ser l'únic grup d'animals que es va tornar diabètic.

1.2.3. LESIÓ PER AIXAFAMENT DEL NERVI CIÀTIC ESQUERRE

A tots els animals se'ls va sotmetre a una lesió per aixafament del nervi ciàtic esquerre a les 4 setmanes un cop establerta la DM en els animals del grup Tg-STZ. L'extremitat posterior dreta no va ser manipulada quirúrgicament i es va utilitzar com a control.

El procediment quirúrgic fou el següent:

- Els animals es van anestesiar amb Ketamina (100 mg/kg; *Imalgene 500*, Rhône-Merieux, Lyon, França) i Xilacina (10 mg/kg; *Rompun*, Bayer, Leverkusen, Alemanya) intraperitoneal, i Bupivacaïna intradèrmica al lloc de la lesió com a anestèsic local.
- Es va incidir sobre la pell caudal de la part posterior de l'extremitat posterior esquerra, a nivell del trocànter major del fèmur. Es van separar els plans musculars mitjançant una dissecció roma i es va exposar el nervi ciàtic (Fig2).



Figura 2. Abordatge del procediment quirúrgic i exposició del nervi ciàtic esquerre de l'animal.

- Mitjançant un fòrceps (*Diameda Instruments GmbH*, Tuttlingen, Alemanya) es va sotmetre el nervi ciàtic a una lesió per aixafament durant 30 segons. L'acció es va repetir 3 vegades consecutives (Fig3).

Figura 3. Lesió per aixafament del nervi ciàtic esquerre mitjançant un fòrceps.



- Finalment es va suturar la pell amb grapes quirúrgiques.

1.3. PRESA DE MOSTRES

Quatre setmanes després de la cirurgia i prèviament a l'eutanàsia dels animals es van recollir les mostres dels GAD. El procediment fou el següent:

- Els animals es van anestesiari amb isofluorane.
- Es varen extraure els 3 GAD del nervi ciàtic, localitzats a les vèrtebres lumbars L4, L5 i L6, de l'extremitat lesionada (esquerre) i de l'extremitat no lesionada (dreta).
- Els animals es van eutanasiar per dislocació cervical.

2. PROCESSAMENT DE LES MOSTRES

De cada grup experimental (n=60) es van fer *pools* dels GAD de 10 animals de cada extremitat. Dels 6 *pools* de GAD de cada extremitat/grup experimental, 3 es van utilitzar per a l'estudi de *microarrays* i 3 per fer la PCR quantitativa en temps real (RT-qPCR). Es van utilitzar *pools* diferents ja que el volum de les mostres una vegada realitzada la tècnica de *microarrays* va resultar insuficient per a fer la seva validació amb la RT-qPCR. Les mostres obtingudes es van congelar en nitrogen líquid i es van conservar a -80°C.

2.1. EXTRACCIÓ DEL RNA

Per realitzar l'extracció del RNA de les mostres per als estudis de *microarrays* i de RT-qPCR les mostres primer es van tractar amb aigua amb dietilpirocarbonat (DEPC) (Sigma).

Preparació de l'aigua-DEPC

- Omplir amb el volum desitjat d'aigua un recipient lliure de RNAses (vidre pyrex, autoclavat 3h a 250°C)
- Afegir el DEPC fins a 0,01%, es deixa 12h a 37°C,
- Autoclavar-ho dues vegades per inhibir el DEPC.

El protocol seguit per l'extracció fou el següent:

- Afegir 1ml Quiazol (*Quiagen*)/g de teixit.
- Homogeneïtzar el teixit amb el *TissueRuptor*.
- Centrifugar de 10 minuts a 1200rpm a 4°C, per eliminar les restes de teixit.

- Incubar 5 minuts a 20°C, per dissociar els complexos nuclioproteics.
- Afegir 0,2 ml de cloroform per a cada ml de Quiazol utilitzat.
- Agitar 15 segons amb el vòrtex.
- Incubar 2-3 minuts a 20°C.
- Centrifugar 10 minuts a 1200rpm a 4°C.
- Afegir 0,5 ml d'isopropanol per cada ml de Quiazol utilitzat, per a recuperar la fase aquosa de cada mostra.
- Incubar 10 minuts a 20°C
- Centrifugar 10 minuts a 1200rpm a 4°C, per a fer precipitar l'RNA.
- Decantar el sobrenedant i rentar el *pellet* amb etanol al 70% (amb aigua tractada amb DEPC), un mil·lilitre per a cada ml de Quiazol utilitzat.
- Vortejar.
- Centrifugar a 5 minuts a 800rpm a 4°C.
- Decantar el sobrenedant fins que només quedi el *pellet* de RNA.
- Resuspendre amb aigua pretractada amb DEPC
- Incubar 10 minuts a 55°C.

2.2. ANÀLISI DE QUALITAT DEL RNA

Un cop obtingut el RNA de les mostres de teixit es va procedir a analitzar la integritat i la puresa mitjançant espectrofotometria i nanoelectroforesi, usant l'espectòmetre *NanoDrop ND-1000* (NanoDrop Technologies, Wilington) i l'assaig *Nano lab-on-a-chip* pel RNA eucariota amb *Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies), respectivament.

Les mostres es varen tornar a emmagatzemar a -80°C fins a la seva utilització.

3. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA: MICROARRAYS

Per a dur a terme l'anàlisi de l'expressió gènica es van utilitzar sondes d'oligonucleòtids fabricades per la casa comercial *Affymetrix*.

El model utilitzat va ser *Affymetrix GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Array*.

Les imatges van ser processades amb el *Microarray Analysis Suite 5.0 (Affymetrix)*.

L'anàlisi va ser dut a terme per la Unitat d'Estadística i Bioinformàtica de l'Institut de Recerca de l'Hospital Universitari de la Vall d'Hebron (IRHUVH).

Els paràmetres del control de qualitat utilitzat (3'/5' ratio del conjunt de les mostres per gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa i beta-actina <1,5) van determinar que la qualitat dels *microarrays*, és a dir del cRNA, era bona.

3.1. PROCESSAMENT DE LES DADES DELS MICROARRAYS

Es varen avaluar les dades de l'expressió gènica de les dues extremitats, lesionada i intacte, de tots els grups, ICR, ICR-STZ, Tg i Tg-STZ.

El filtrat de les dades i l'anàlisi estadístic va ser dut a terme per la Unitat d'Estadística i Bioinformàtica de l'Institut de Recerca de l'Hospital Universitari de la Vall d'Hebron (IRHUVH).

La primera expressió dels valors va ser preprocessada utilitzant el mètode *multi-array average (RMA)* per a normalitzar-los (Irizarry et al, 2003). Es un procés que consta de 3 passos que integra la correcció del

background, la normalització i el resum dels valors de les mostres. Aquests valors normalitzats van ser la base de tot l'anàlisi.

La correcció del *background* es va fer sotmetent les dades a un filtrat no específic per descartar gens amb:

- senyal molt baixa, aquells gens que la seva senyal mitjana en cada grup no arribava al llindar mínim.
- variabilitat molt baixa, aquells gens que la seva desviació estàndard entre totes les mostres no sobrepassava el llindar mínim.

La normalització va consistir en la selecció dels gens amb expressió diferencial entre les diferents condicions del filtrat no específic, es va basar en un model d'anàlisi lineal amb la moderació empírica de *Bayes* de la variància de les estimacions, seguint la metodologia desenvolupada per *Smyth* (*Smyth*, 2004).

De l'anàlisi se n'obtenen tests estadístics estàndards que van permetre resumir el valor de les mostres: el *fold-change* (FC), el T-test moderat i els p-valors que permeten ordenar els gens en funció de que tinguin major o menor expressió diferencial.

Amb el mètode de *Benjamini i Hochberg* (*Benjamini i Hochberg*, 1995) els p-valors van ser ajustats per obtenir un bon control sobre la taxa de falsos resultats. Només aquelles sondes hibridades que van presentar un p-valor ajustat inferior a 0,01, van ser estudiats amb l'objectiu d'incrementar el poder estadístic i reduir el "soroll" innecessari.

Tots els anàlisis estadístics es van dur a terme utilitzant el paquet informàtic estadístic lliure R i les llibreries creades per l'anàlisi de dades de *microarrays* pel *Bioconductor Project* (www.bioconductor.org) (*Gentelman et al*, 2005).

3.2. ANÀLISI DE LES DADES DELS MICROARRAYS

Un cop normalitzats i resumits els valors de les mostres es va procedir a analitzar-les amb diferents eines.

3.2.1. VALOR DEL FC

Per analitzar els canvis en l'expressió gènica deguts a la degeneració i regeneració nerviosa en condicions de DM, les mostres es van comparar amb el valor de l'expressió gènica dels GAD de l'extremitat no lesionada dels animals controls ICR que es va prendre com a referència, *baseline*. El nivell d'expressió dels gens d'aquests grup, per tant, va ser normalitzat a un FC de 1.

En funció del seu FC valor, el nivell d'expressió dels gens es van classificar com a:

- Infrarregulats: gens amb FC d'entre 0 i 1 respecte al *baseline*.
- Nivell de baseline: gens amb valor de FC entre 1 i 2 respecte el *baseline*.
- Sobrerregulats més de 2 vegades: gens amb FC igual o superior a 2 respecte el *baseline*.

3.2.2. ANÀLISIS COMPARATIUS

Després d'estudiar l'expressió gènica en els GAD de les extremitats lesionades i no lesionades de tots els grups d'animals, es va procedir a l'estudi en detall de 4 comparatives diferents.

I. Anàlisi comparatiu: ICR lesionades vs ICR no lesionades

Es va comparar el perfil de l'expressió gènica dels GAD de les extremitats lesionades amb les extremitats no lesionades dels animals ICR. Les diferències d'expressió gènica en els GAD a les 4 setmanes després d'una lesió nerviosa per aixafament indicaria quins gens poden estar relacionats amb la regeneració nerviosa en aquest punt temporal en un animal sa.

II. Anàlisi comparatiu: Tg-STZ no lesionades vs ICR no lesionades

Es va comparar el perfil de l'expressió gènica dels GAD de les extremitats no lesionades dels animals Tg-STZ amb la de les extremitats no lesionades dels animals ICR. Les diferències d'expressió gènica en els GAD 8 setmanes després d'haver-se instaurat un procés diabètic permetrien conèixer quins gens podien estar relacionats amb l'efecte de la DM en la degeneració nerviosa de la PND en aquest punt temporal.

III. Anàlisi comparatiu: Tg-STZ lesionades vs ICR lesionades

Es va comparar el perfil de l'expressió gènica dels GAD de les extremitats lesionades dels animals Tg-STZ amb el de les extremitats lesionades dels animals ICR. Les diferències d'expressió gènica en els GAD a les 4 setmanes després d'una lesió nerviosa per aixafament, i 8 setmanes un cop s'ha instaurat un procés diabètic, indicarien quins gens poden estar relacionats amb la regeneració nerviosa, i quin efecte hi pot tenir la PND en aquest punt temporal.

IV. Anàlisi conjunt: Tg-STZ no lesionades i lesionades vs ICR no lesionades i lesionades

Es van avaluar conjuntament els perfils de l'expressió gènica obtinguts de la comparativa entre extremitats no lesionades dels Tg-STZ i els ICR (II) i de la comparativa entre extremitats lesionades dels Tg-STZ i els ICR (III), per veure quins gens eren comuns i quins d'ells s'expressaven únicament en una o altra (veure apartat 3.2.5).

3.2.3. HEATMAP CLUSTERING

Els gens amb una expressió diferencial significativa van ser agrupats en *clusters* amb l'objectiu de trobar-ne patrons comuns d'expressió. Es va fer una agrupació jeràrquica amb una distància euclidiana per formar els grups del *cluster* i així poder dibuixar el *heatmap* on cada columna representa un sol chip (o sonda) ($n=3$) format per *pools* individuals de 10 animals i cada fila és un gen. Per poder visualitzar-ho se segueix una escala colorimètrica on el color vermell indica un nivell d'expressió superior al valor de referència o *baseline* d'un gen en concret, el color verd indica un nivell d'expressió més baix que el *baseline* i, finalment, el color negre indica que el nivell d'expressió és molt proper al del *baseline*.

Es va aplicar una escala multidimensional en la distància de les matrius utilitzades per agrupar les mostres, amb l'objectiu de produir representacions gràfiques que ens ajudessin a descobrir agrupacions entre les mostres.

Per realitzar aquest anàlisi es van utilitzar les següents eines informàtiques:

- *Gene Cluster 3.0* (Eisen et al, 1998)
- *Gene Tree View 1.6* (Stanford University)

3.2.4. ANÀLISI DELS PROCESSOS BIOLÒGICS

Per a conèixer els processos biològics implicats, els llistats de gens obtinguts de cada una de les comparatives van ser analitzades amb les següents bases de dades:

- *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID) (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) (Dennis et al, 2003; Huang et al, 2009)
- *Center for Quantitative Biology* de la Universitat de Princeton (<http://www.princeton.edu/quantbio>)
- *Gene Home* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>).

L'anàlisi de les significances (o importàncies) biològiques es va basar en un anàlisi a gran escala amb l'objectiu d'establir si els gens que tenien expressió diferencial apareixien concentrats o es trobaven particularment absents en algunes de les categories de la *Gene Ontology* (GO) (<http://www.geneontology.org>) (Rhee et al, 2008), i que poguessin estar relacionades amb processos biològics involucrats en aquest estudi.

Els processos biològics de cada gen van ser assignats segons GO, només es van seleccionar aquells processos que tenien una font d'evidència experimental, amb la seva conseqüent referència dirigida a la literatura, i se'n van descartar les fonts computacionals i les indirectes (Rhee et al, 2008)

3.2.5. ANÀLISI CONJUNT

Es va fer un anàlisi posant en comú els gens amb expressió diferencial dels GAD de les extremitats no lesionades dels animals Tg-STZ *versus* les extremitats no lesionades dels animals ICR (II) i els gens amb expressió diferencial dels GAD de les extremitats lesionades dels animals Tg-STZ *versus* les extremitats lesionades dels animals ICR (III). El diagrama de Venn va ser utilitzat per veure gràficament l'agrupació dels gens de cada comparativa.

4. VALIDACIÓ PER PCR QUANTITATIVA EN TEMPS REAL

Per validar els valors de l'expressió gènica obtinguts mitjançant la tècnica de *microarrays*, es va realitzar la tècnica de PCR quantitativa en temps real (RT-qPCR). Les mostres de RT-qPCR eren trípliques de mostres de cDNA que provenien d'un *pool* de 10 mostres de RNA.

Es va testar el nivell d'expressió dels gens *Atf3*, *Gal*, *Npy* i *Nts* en tots els grups d'animals, 30 animals per grup.

4.1. TRANSCRIPCIÓ INVERSA

La retrotranscripció o transcripció inversa es va realitzar per sintetitzar cDNA a partir de l'RNA total obtingut per a cada mostra.

A partir de les mostres d'RNA obtingudes dels GAD, es va calcular la concentració de cada mostra mitjançant l'espectròmetre *NanoDrop D-100* (NanoDrop Technologies, Wilmington) i es va portar a terme la transcripció inversa. El protocol següent fou el següent:

- D'1µg de RNA i mitjançant la utilització de *SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), es va obtenir el cDNA de cada mostra seguint el protocol de la casa comercial.
- Es va mesclar una dilució 1/5 de cada cDNA, el *FastStart DNA Master SYBR Green I* (Roche, Basel, Switzerland) i els primers comercials específics per a cada gen a estudiar (Roche, Basel, Switzerland). Es van realitzar dúpliques del DNA de cada mostra.

Gen	Seqüències dels oligonucleòtids
36B4	5'-GGCCCTGCACTCTCGCTTT-3' i 5'-TGCCAGGACGCGCTTGT-3'
Atf3	5'-GCTGGAGTCAGTTACCGTCAA-3' i 5'-CGCCTCCTTTTCCTCAT-3'
Gal	5'-CTGGCTCCTGTTGGTTGTG-3' i 5'-TGTTCAAGGCTCAACCTCTC-3'
Npy	5'-CCGCTCTGCGACTACAT-3' i 5'-TGTCTCAGGGCTGGATCTCT-3'
Nts	5'TGACTCTCCTGGCTTTCAGC-3' i 5'-TCCAGGGCTCTCACATCTTC-3'

Seguint el protocol del proveïdor, Roche, es va realitzar la Real-Time PCR en el termociclador espectrefluoromètric, *Roche Light Cycler System (LC480)*.

El programa utilitzat constava de les següents etapes: 10 minuts a 95°C; 10 segons a 95°C; 5 segons a 57°C i 10 segons a 72°C i es va repetir 45 cicles.

Les dades obtingudes amb el termociclador espectrefluoromètric es van tornar a avaluar la quantitat de RNA present en les mostres analitzant mitjançant el valor Ct (*threshold cycle* - llindar del cicle-) que representa el cicle de la reacció PCR en la qual la fluorescència que detecta el termociclador supera un nivell llindar establert prèviament, el mateix en totes les mostres i experiments.

La fórmula que es va utilitzar per calcular els resultats és una *ratio* que compara el valor de la Ct de cada una de les mostres amb la mitjana dels valors de Ct del grup de les extremitats no lesionades dels animals ICR i tot això es va normalitzar pels valors corresponents al gen constitutiu que vàrem utilitzar, el *housekeeping 36B4* (Pfaffl et al, 2001). L'anàlisi estadístic va consistir en una T-test.

V. RESULTATS

1. AVALUACIÓ DE LA DIABETIS MELLITUS I DE LA LESIÓ PER AIXAFAMENT DEL NERVI CIÀTIC

1.1. AVALUACIÓ DE LA DIABETIS MELLITUS

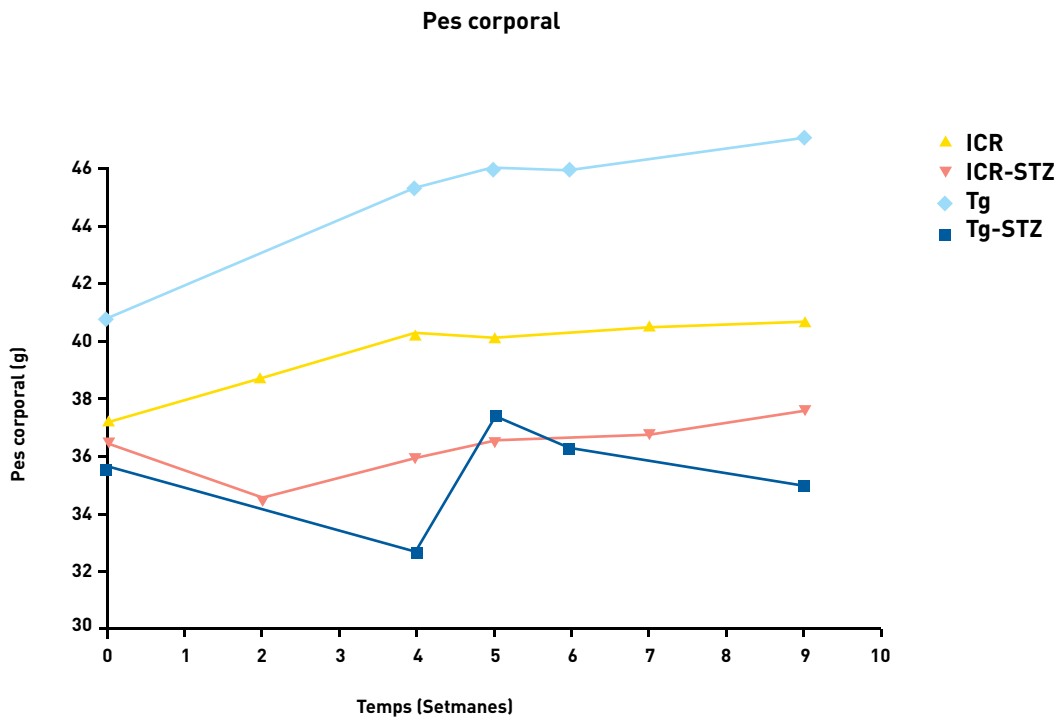
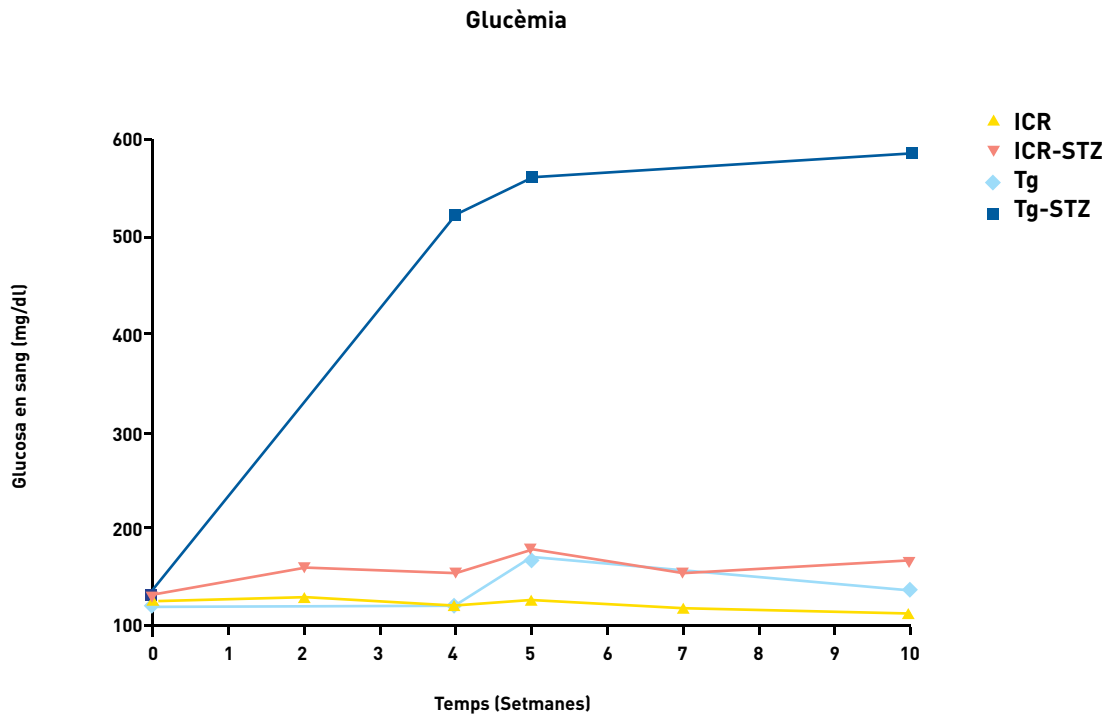
El desenvolupament de la DM es va estudiar valorant dos paràmetres, els nivells de glucèmia i l'evolució del pes corporal (Fig1). Evolució cronològica:

A les 2 setmanes després d'administrar el tractament (5 dosis baixes STZ o vehicle):

- els animals Tg tractats amb STZ (Tg-STZ) van desenvolupar diabetis de manera manifesta (glucosa en sang > 300 mg/dl) de forma sincrònica.
- la resta de grups no varen desenvolupar diabetis

Durant les 8 setmanes següents (4 fins a la cirurgia i 4 fins la presa de mostres i el sacrifici):

- els animals Tg-STZ van presentar un hiperglucèmia sostinguda i van mostrar una lleugera pèrdua de pes.
- els animals Tg no tractats (Tg) es van mantenir normoglucèmics, no van desenvolupar una diabetis manifesta (<300 mg/dl de glucosa en sang) i van mostrar un lleuger guany de pes progressiu durant tot el procés experimental.
- els animals ICR tractats amb STZ (ICR-STZ) van desenvolupar una moderada hiperglucèmia a les 4 setmanes després del tractament amb STZ i van anar augmentant el pes corporal fins al final de l'estudi.
- els animals ICR no tractats (ICR) es van mantenir normoglucèmics durant tot el procés experimental i van mostrar un augment gradual de pes corporal.



1.2. AVALUACIÓ DE LA LESIÓ PER AIXAFAMENT DEL NERVI CIÀTIC

Un cop realitzada la lesió per aixafament del nervi ciàtic esquerre, els animals es van recuperar totalment de l'anestèsia i els individus de tots els grups van presentar una paràlisi ambulatoria de l'extremitat lesionada.

Els animals de tots els grups van mostrar una millora gradual de la marxa fins a estar totalment recuperats 4 setmanes després de la lesió nerviosa.

Figura 1. Avaluació de la progressió de la DM (mitjana de 60 animals per grup). (A) Glucèmia sense dejú, després del tractament amb 5 dosis baixes de STZ (30 mg/kg), administrat a la setmana 0. El límit màxim de detecció del glucòmetre és de 600 mg/dl. (B) Pes viu corporal.

2. ANÀLISI DE LES DADES OBTINGUES DELS *MICROARRAYS*

Avaluant les dades crues obtingudes de la normalització dels valors dels *microarrays* de les mostres dels GAD de les extremitats lesionades i no lesionades, es veren identificar 11918 sondes híbrides amb expressió diferencial.

El *baseline*, valor de l'expressió gènica del grup que es va prendre com a referència, es va establir amb les dades dels GAD de l'extremitat no lesionada dels animals ICR en totes les comparacions realitzades. Per tant, el nivell d'expressió dels gens d'aquests grup va ser normalitzat a un *fold change* (FC) de 1.

A continuació, de cada comparació realitzada, es descriuen els gens amb expressió significativament diferencial, quins estaven infrarregulats i quins estaven sobrerregulats més de dues vegades, així com els processos biològics i les vies que estaven activades o inactivades en cada una d'elles.

No es varen tenir en compte els gens desconeguts ni els que formaven part de processos biològics amb molt poca representació, aquests últims van ser ajuntats, en cada cas, en un grup anomenat miscel·lània.

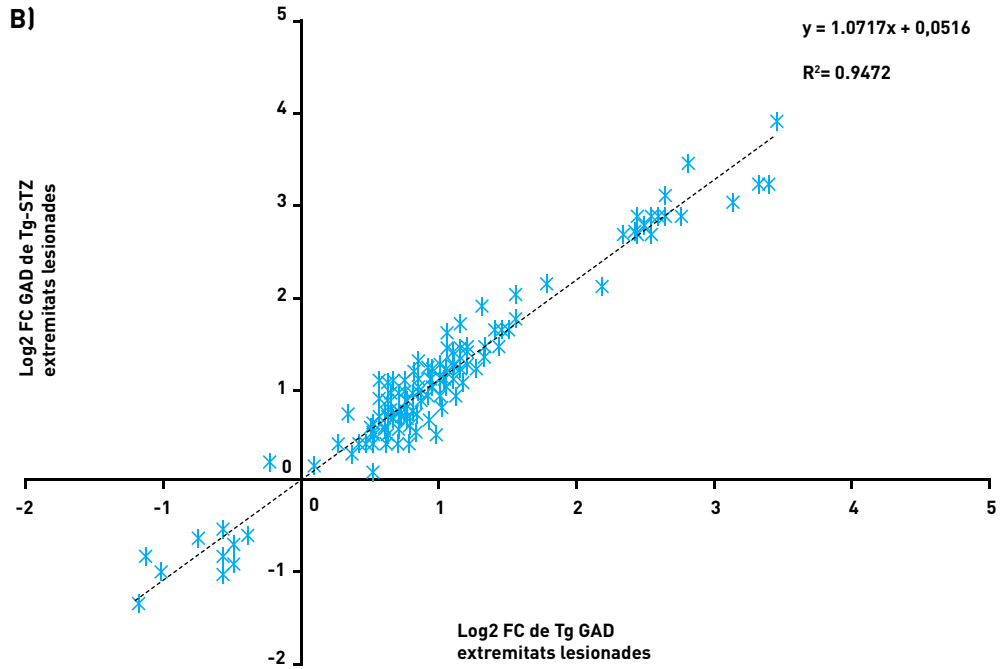
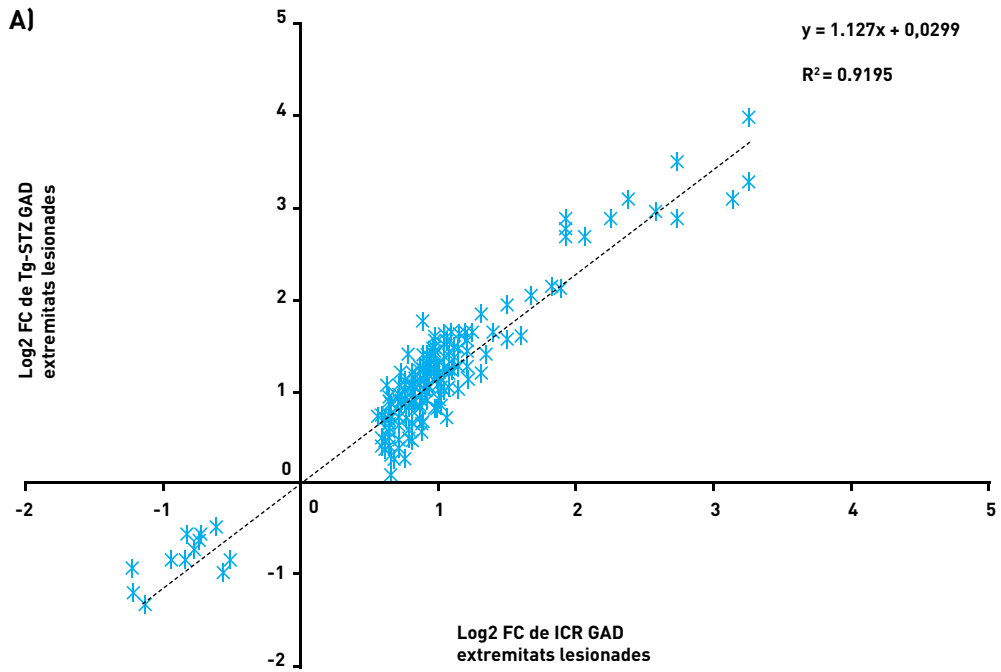
2.1. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA DE TOTS ELS GRUPS

Al avaluar les dades de l'expressió gènica en els GAD de les extremitats de tots els grups d'animals, els ICR, els ICR-STZ, els Tg i els Tg-STZ, es va observar una marcada tendència o linealitat (Fig2):

- Al comparar l'expressió gènica dels GAD de les extremitats lesionades dels animals Tg-STZ i dels ICR (Fig2A), es va obtenir una recta amb un pendent de $y = 1.127x + 0,0299$ i $R^2 = 0.9195$.
- Al comparar l'expressió gènica dels GAD de les extremitats lesionades dels animals Tg-STZ i dels Tg (Fig2B), es va obtenir una recta amb un pendent de $y = 1.0717x + 0,0516$ i $R^2 = 0.9472$.

La linealitat o tendència va ser molt similar en aquestes dues comparatives. Els gens tenien una expressió similar en les extremitats lesionades de tots els grups vs les no lesionades.

A les 4 setmanes després de l'aixafament del nervi ciàtic l'efecte de la lesió nerviosa va ser més important que l'efecte que és pogués detectar per la pròpia DM, per la PND i de les conseqüents alteracions en la degeneració i regeneració nerviosa.



Al comparar la expressió gènica dels GAD de les extremitats lesionades del grup ICR-STZ vs les extremitats lesionades del grup ICR no es va detectar cap tipus d'alteració gènica degut a un possible efecte tòxic de la STZ en els GAD. Amb les dades del grup ICR-STZ no s'hi va tornar a treballar donat que amb aquesta comparativa ja es van poder descartar els efectes tòxics de la STZ en els GAD dels animals controls.

Figura 2. Anàlisi de l'expressió gènica en els GAD de les extremitats de tots els grups d'animals. Com a baseline s'utilitza l'expressió gènica dels GAD de les extremitats no lesionades dels animals ICR.

A) Expressió gènica dels GAD de les extremitats lesionades dels Tg-STZ vs les extremitats lesionades dels ICR. Eix Y: FC dels gens de les extremitats lesionades dels Tg-STZ; Eix X: FC gens de les extremitats lesionades dels ICR.

B) Expressió gènica dels GAD de les extremitats lesionades dels Tg-STZ vs les extremitats lesionades dels Tg. Eix Y: FC dels gens de les extremitats lesionades dels Tg-STZ; Eix X: FC de les extremitats lesionades dels Tg.

2.2. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA DELS GAD DE LES EXTREMITATS DELS ANIMALS TG-STZ VS LES EXTREMITATS DELS ANIMALS ICR

Per conèixer els gens i els processos biològics implicats en la degeneració i la regeneració nerviosa en una situació de DM es van realitzar 2 comparacions de l'expressió gènica dels GAD de les extremitats dels diferents grups d'animals:

Tg-STZ no lesionades vs ICR no lesionades

Per determinar el gens i els processos biològics implicats en la degeneració nerviosa a causa de la DM a les 8 setmanes després de ser induïda la malaltia.

Tg-STZ lesionades vs ICR lesionades

Per determinar el gens i els processos biològics implicats en la regeneració nerviosa a les 4 setmanes després d'una lesió nerviosa en una situació DM.

En la representació gràfica, *heatmap clustering*, es van mostrar els valors del FC dels gens en una escala colorimètrica i es van agrupar en funció del seu procés biològic (GO). Els gens amb similar nivell d'expressió estan agrupats amb altres gens amb semblant nivell d'expressió. En les comparacions de l'expressió gènica en els GAD de les extremitats dels animals Tg-STZ vs els animals ICR es va observar que:

- el grup d'animals ICR apareixien agrupats a l'esquerra de la imatge (les 6 columnes de l'esquerra),
- el grup Tg-STZ apareixia a la dreta de la imatge (les 6 columnes de la dreta).

Això indicava que l'efecte de la DM era més rellevant que l'efecte de la lesió nerviosa per aixafament.

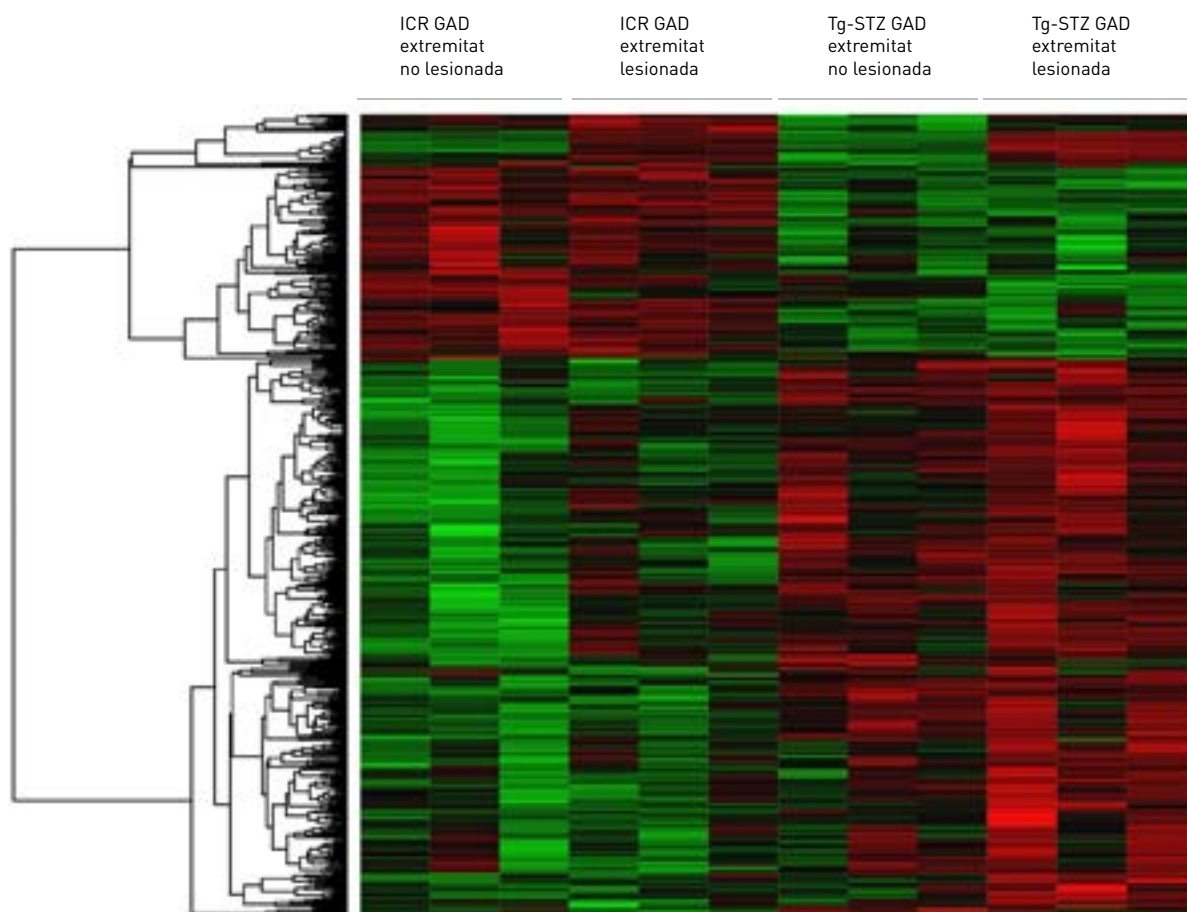


Figura 3. *Heatmap clustering* dels gens sobrerregulats més de 2 vegades o dels infrarregulats dels GAD de tots els grups estudiats. Cada columna representa un sol chip (o sonda) ($n=3$) format per *pools* individuals de 10 animals. Cada fila representa a un gen.

3. I. ANÀLISI COMPARATIU: ICR LESIONADES VS ICR NO LESIONADES

L'anàlisi de l'expressió gènica dels GAD de les extremitats lesionades vs les extremitats no lesionades en animals ICR es va dur a terme per determinar si hi havia regeneració nerviosa 4 setmanes després d'una lesió per aixafament del nervi ciàtic en animals sans.

A l'avaluar l'expressió gènica en els GAD de les extremitats lesionades amb les extremitats no lesionades dels animals ICR es van identificar 113 gens amb expressió diferencial significativa (Fig4). Cada gen correspon a una sonda hibridada d'*Affymetrix* i té una codificació especial, *Affymetrix ID*, de vegades un mateix nom de gen correspondria a una o més sondes.

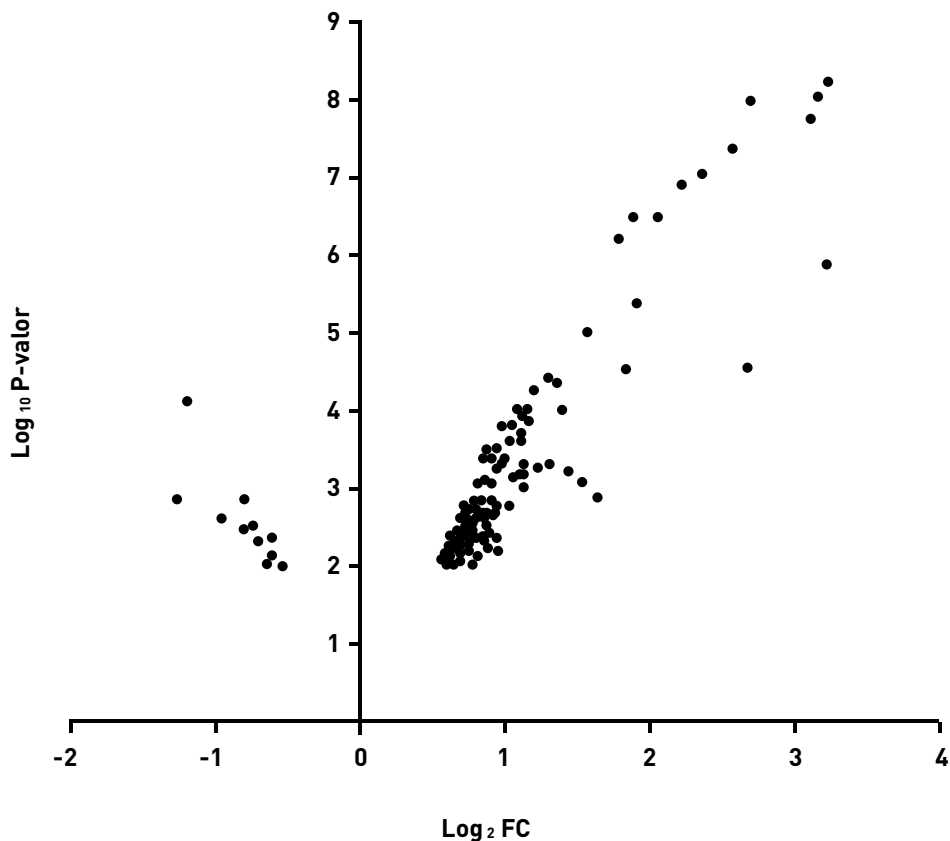


Figura 4. *Volcano plot* dels 113 gens amb expressió diferencial dels GAD de les extremitats lesionades vs les no lesionades dels animals ICR. Els p-valors més significants apareixen a la part alta de la gràfica i els gens més sobrerregulats apareixen a la part dreta de la gràfica.

Dels 113 gens (Fig5), 102 gens (90,26%) estaven sobrerregulats. Els nivells de sobrerregulació mostraven variació: 72 gens (63,71%) estaven sobrerregulats de 1 a 2 vegades i 30 gens (26,55%) més de 2 vegades (Fig6 i Taula 1). Dels 113 gens, 11 (9,73%) estaven infrarregulats (Taula 2).

Amb les bases de dades *Gene Ontology* (GO) (Rhee et al, 2008) i *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID) (Dennis et al, 2003) es van analitzar els 113 gens per tal d'identificar subgrups relacionats amb la regeneració del SNP en animals ICR i poder associar-los amb possibles funcions biològiques.

Dels 113 gens amb expressió diferencial significativa, els processos biològics més representats van ser (Fig5):

- Senyalització [15 gens, (13,27%)]
- Desenvolupament del sistema nerviós [10 gens, (8,85%)]
- Metabolisme [10 gens, (8,85%)]
- Adhesió cel·lular [9 gens, (7,96%)]
- Matriu extracel·lular [6 gens, (5,31%)]
- Resposta immunitària [6 gens, (5,31%)]
- Proliferació cel·lular [6 gens, (5,31%)]
- Regulació de la transcripció [5 gens, (4,42%)]
- Transmissió sinàptica [5 gens, (4,42%)]
- Transport [5 gens, (4,42%)]
- Organització dels component cel·lulars [4 gens, (3,54%)]
- Diferenciació cel·lular [4 gens, (3,54%)]
- Apoptosi [3 gens, (2,65%)]

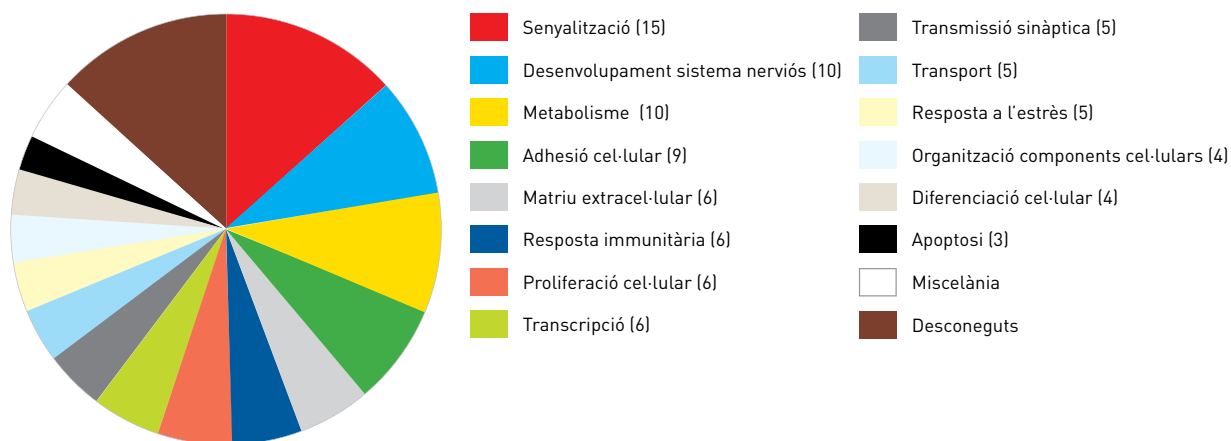


Figura 5. Processos biològics de *Gene Ontology* (GO) dels 113 gens amb expressió diferencial significativa en els GAD de les extremitats lesionades dels animals ICR. (n = nombre de gens per categoria).

Categories funcionals dels 30 gens sobrerregulats més de 2 vegades (Fig6):

- Desenvolupament dels sistema nerviós [6 gens, (20%)]
- Senyalització [3 gens, (10%)]
- Metabolisme [3 gens, (10%)]
- Adhesió cel·lular [3 gens, (10%)]
- Matriu extracel·lular [2 gens, (6,67%)]
- Proliferació cel·lular [2 gens, (6,67%)]
- Transmissió sinàptica [2 gens, (6,67%)]
- Diferenciació cel·lular [2 gens, (6,67%)]
- Apoptosi [1 gen, (3,33%)]

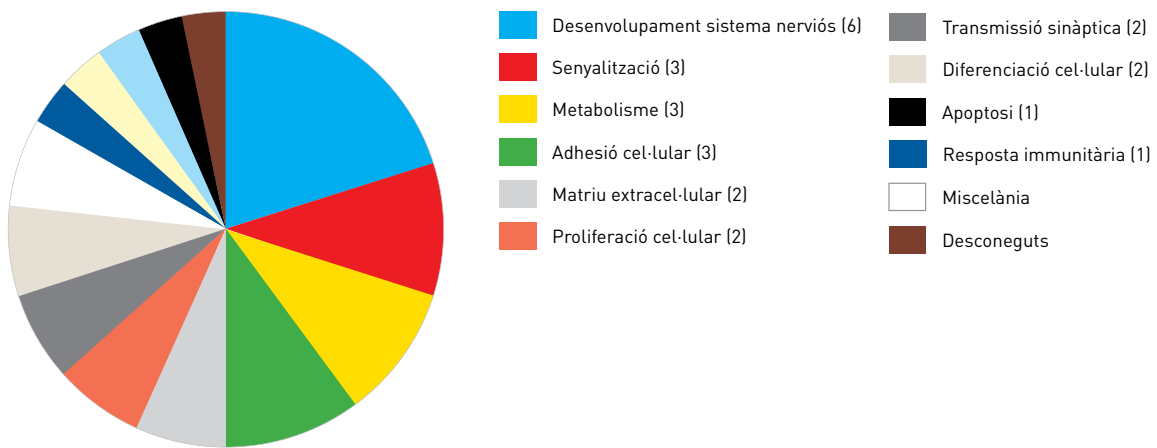


Figura 6. Processos biològics de *Gene Ontology* (GO) dels 30 gens sobrerregulats més de 2 vegades en els GAD de les extremitats lesionades dels animals ICR. (n= nombre de gens per categoria).

L'anàlisi amb *Clusters* va representar visualment els subgrups dels diferents gens sobreexpressats més de 2 vegades i infraexpressats i els seus patrons d'expressió (Fig7). Aquest anàlisi va demostrar que els gens expressats en els GAD de les extremitats lesionades vs les no lesionades dels animals ICR pertanyien a diferents termes de GO i no corresponien exclusivament a un únic procés de regeneració nerviosa.

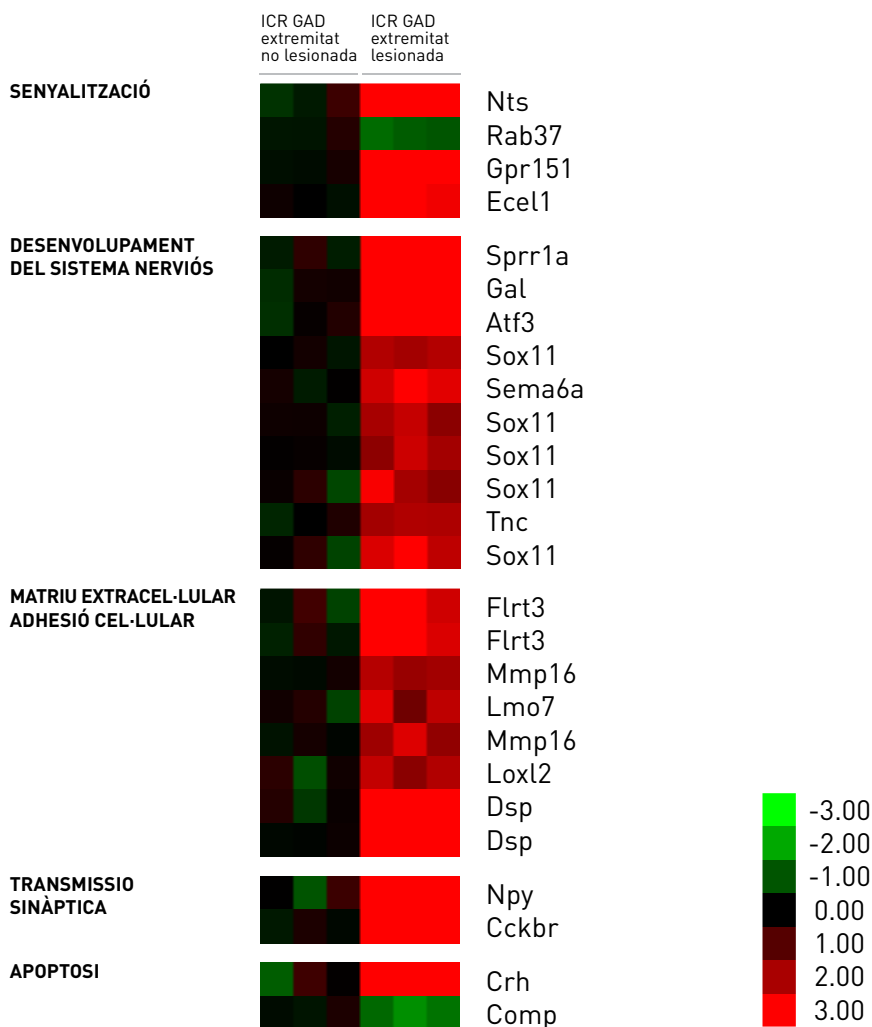


Figura 7. *Heatmap clustering* dels gens sobreexpressats més de 2 vegades o dels infraexpressats dels GAD de les extremitats lesionades vs les no lesionades dels animals ICR.

Gens involucrats amb el desenvolupament del sistema nerviós estan relacionats amb reparació nerviosa, desenvolupament de les projeccions neuronals, guia de l'axó, regeneració axonal o neurogènesi:

- Factors de transcripció com *SRY-box containing gene 11* (Sox11) i l'*activating transcription factor 3* (Atf3).
- Tensacina (Tnc), semaforines (Sema6a), *Small proline-rich* (Sprr1a), o galanina (Gal).

Gens relacionats amb la transmissió sinàptica com el neuropèptid Y (Npy) o el receptor de la colecistoquinina B (Cckbr).

Gens associats amb la reorganització del microambient local, de la part lesionada del nervi, com:

- Adhesió cel·lular: *LIM domain only 7* (Lmo7) o *fibronectin leucine rich transmembrane protein 3* (Flrt3).
- Remodelació de la matriu extracel·lular circumdant com: *collagen, type XVIII, alpha 1* (Col18a1); *collagen, type III, alpha 1* (Col3a1); *collagen, type V, alpha 2* (Col5a2); *periostin, osteoblast specific factor* (Postn); *lysyl oxidase-like 2* (Loxl2) o *matrix metalloproteinase 16* (Mmp16).

Gens involucrats en vies de senyalització cel·lular que engloben diversos processos biològics:

- Via de senyalització de neuropèptids: *adenylate cyclase activating polypeptide* (Adcyap1) i *endothelin converting enzyme-like 1* (Ecel1).
- Transducció de senyals: neurotensina (Nts), neuromodulador dels clàssics neurotransmissors del sistema nerviós i *G protein-coupled receptor 151* (Gpr151) que és una proteïna G acoblada a un receptor.
- Senyalització cel·lular en un sentit més ampli, com: *angiopoietin-like 2* (Angptl2), *AXL receptor tyrosine kinase* (Axl) o *TRAF2 and NCK interacting kinase* (Tnik).

Gens associats a vies de transport molecular i canals iònics:

- Canals de calci, com *calcium channel, voltage-dependent, alpha2/delta subunit 1* (Cacna2d1) i canals de potassi, com *potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, beta member 1* (Kcnmb1).
- Canals transportadors de soluts, com: *solute carrier family 15, member 3* (Slc15a3); *solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 19* (Slc6a19) i *solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4* (Slc6a4).

Gens relacionats amb processos apoptòtics:

- Gen involucrat en la regulació negativa de l'apoptosi, *Prohibitin* (Phb).
- Gen proapoptòtic que apareix infrarregulat, *cartilage oligomeric matrix protein* (Comp).
- Gen associat a processos de neuroprotecció, *Corticotropin releasing hormone* (Crh).

Gens de la resposta inflamatòria o que tenien un paper en la resposta immune com: *Immunoglobulin heavy chain (gamma polypeptide)* (Ighg); *interleukin 13 receptor, alpha 1* (Il13ra1); *mannose-binding lectin (protein C) 2* (Mbl2); *protein tyrosine phosphatase, receptor type, C* (Ptprc), (Ptprj) i *pentraxin related gene* (Ptx3).

Taula 1. Gens sobrerregulats ≥ 2 vegades en els GAD de les extremitats lesionades vs les extremitats no lesionades dels animals ICR i amb p-valor < 0.01 . Les columnes mostren (de esquerra a dreta) la identificació d'*Affymetrix* (*Affymetrix ID*), símbol del gen, nom del gen, la mitjana del FC de cada sonda hibridada (en negreta), els valors en parèntesis representen la desviació estàndard (DS) del FC i el p-valor utilitzant el mètode de *Benjamini i Hochberg*.

Affymetrix ID	Símbol del gen	Nom del gen	FC de ICR GAD extremitat lesionada (DS)	P-valor
1448894_at	Akr1b8	aldo-keto reductase family 1, member B8	2.16 [0.20]	0.00023424
1449363_at	Atf3	activating transcription factor 3	5.90 [0.56]	4.1587E-08
1435541_at	Btc	betacellulin, epidermal growth factor family member	2.59 [0.40]	9.7866E-05
1454770_at	Cckbr	cholecystokinin B receptor	4.15 [0.37]	3.5855E-07
1457984_at	Crh	corticotropin releasing hormone	6.55 [0.91]	1.1004E-08
1416613_at	Cyp1b1	cytochrome P450, family 1, subfamily b, polypeptide 1	2.07 [0.40]	0.00016629
1435493_at	Dsp	desmoplakin	9.34 [2.27]	1.3801E-06
1435494_s_at	Dsp	desmoplakin	9.16 [2.20]	9.405E-09
1422586_at	Ecel1	endothelin converting enzyme-like 1	3.45 [0.41]	6.4994E-07
1429310_at	Flrt3	fibronectin leucine rich transmembrane protein 3	3.56 [0.82]	3.2825E-05
1453102_at	Flrt3	fibronectin leucine rich transmembrane protein 3	3.12 [0.48]	0.00141102
1434458_at	Fst	follistatin	2.52 [0.47]	4.2846E-05
1460668_at	Gal	galanin	5.14 [0.27]	9.3971E-08
1457555_at	Gpr151	G protein-coupled receptor 151	4.69 [0.71]	1.3475E-07
1421551_s_at	Ifi202b	interferon activated gene 202B	3.74 [0.84]	4.6145E-06
1457666_s_at	Ifi202b	interferon activated gene 202B	3.74 [0.29]	3.4556E-07
1417279_at	Itpr1	inositol 1,4,5-triphosphate receptor 1	2.71 [0.67]	0.00061081
1460203_at	Itpr1	inositol 1,4,5-triphosphate receptor 1	2.45 [0.59]	0.00053977
1437716_x_at	Kif22	kinesin family member 22	2.07 [0.11]	0.00180836
1455056_at	Lmo7	LIM domain only 7	2.30 [0.59]	5.5935E-05
1431004_at	Loxl2	lysyl oxidase-like 2	2.20 [0.29]	0.00048968
1417185_at	Ly6a	lymphocyte antigen 6 complex, locus A	2.46 [0.50]	4.0357E-05
1418787_at	Mbl2	mannose-binding lectin (protein C) 2	2.07 [0.23]	0.00075304
1437568_at	Mmp16	matrix metalloproteinase 16	2.26 [0.44]	0.00014832
1439990_at	Mmp16	matrix metalloproteinase 16	2.14 [0.14]	9.8383E-05
1419127_at	Npy	neuropeptide Y	6.41 [1.36]	2.9103E-05
1422860_at	Nts	neurotensin	8.60 [1.06]	1.9392E-08
1432591_at	Pappa	pregnancy-associated plasma protein A	2.05 [0.17]	0.00025076
1424704_at	Runx2	runt related transcription factor 2	2.12 [0.15]	0.00071441
1436458_at	Sema6a	sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6A	2.94 [0.42]	1.0278E-05
1448301_s_at	Serp1b1a	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 1a	2.18 [0.34]	0.00070975
1429051_s_at	Sox11	SRY-box containing gene 11	2.19 [0.33]	0.00012452
1429372_at	Sox11	SRY-box containing gene 11	2.17 [0.29]	0.00020512
1436790_a_at	Sox11	SRY-box containing gene 11	2.38 [0.68]	0.00057003
1453002_at	Sox11	SRY-box containing gene 11	2.22 [0.09]	0.00010197
1453125_at	Sox11	SRY-box containing gene 11	2.85 [0.53]	0.00085285
1449133_at	Sprr1a	small proline-rich protein 1A	9.37 [0.38]	6.2088E-09
1416342_at	Tnc	tenascin C	2.19 [0.07]	0.00106655
1416431_at	Tubb6	tubulin, beta 6	2.22 [0.13]	0.00013587

Taula 2. Gens infrarregulats en els GAD de les extremitats lesionades vs les extremitats no lesionades dels animals ICR amb un P-valor < 0.01. Les columnes mostren (de esquerra a dreta) la identificació d'*Affymetrix* (*Affymetrix ID*), símbol del gen, nom del gen, la mitjana del FC de cada sonda hibridada (en negreta), els valors en parèntesis representen la desviació estàndard (DS) del FC i el p-valor utilitzant el mètode de *Benjamini i Hochberg*.

Affymetrix ID	Símbol del gen	Nom del gen	FC de ICR GAD extremitat lesionada (DS)	P-valor
1446501_at	Bhlha9	basic helix-loop-helix family, member a9	0.61 (0.05)	0.00503695
1424890_at	Bnc1	basonuclin 1	0.43 (0.04)	7.8966E-05
1451129_at	Calb2	calbindin 2	0.41 (0.05)	0.0014208
1433969_at	Cdkl4	cyclin dependent kinase-like 4	0.59 (0.01)	0.00325983
1419527_at	Comp	cartilage oligomeric matrix protein	0.57 (0.05)	0.00133493
1428102_at	Cpb1	carboxypeptidase B1	0.66 (0.01)	0.00753476
1450930_at	Hpca	hippocalcin	0.52 (0.05)	0.00273811
1421400_at	Kcnmb1	potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, beta member 1	0.65 (0.04)	0.00464018
1433947_at	Rab37	RAB37, member of RAS oncogene family	0.64 (0.03)	0.00865096
1441793_at	Rnf39	ring finger protein 39	0.68 (0.15)	0.00997357
1418412_at	Tpd52l1	tumor protein D52-like 1	0.58 (0.06)	0.00362686

4. II. ANÀLISI COMPARATIU: TG-STZ NO LESIONADES VS ICR NO LESIONADES

L'anàlisi de l'expressió gènica dels GAD de les extremitats no lesionades dels animals Tg-STZ vs les extremitats no lesionades dels animals ICR, es va dur a terme per determinar si el model d'animals Tg-STZ mostrava signes de degeneració nerviosa i, per tant, de PND, a les 8 setmanes un cop instaurat el procés diabètic.

A l'avaluar l'expressió gènica dels GAD de les extremitats no lesionades dels animals Tg-STZ amb les extremitats no lesionades dels animals ICR es van identificar 334 gens amb expressió diferencial significativa (Fig8).

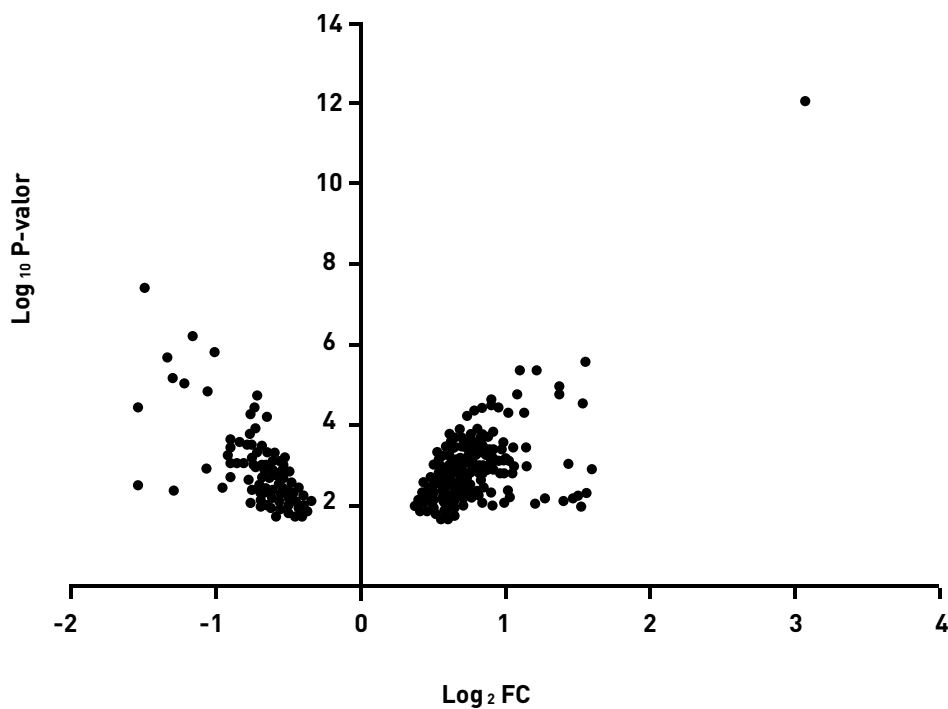


Figura 8. *Volcano plot* dels 334 gens amb expressió diferencial dels GAD de les extremitats no lesionades dels animals Tg-STZ vs les extremitats no lesionades dels animals ICR. Els p-valors més significants apareixen a la part alta de la gràfica i els gens més sobrerregulats apareixen a la part dreta de la gràfica.

Dels 334 gens (Fig9), 225 gens estaven sobrerregulats (67,36%). Dels sobrerregulats 201 (60,48%) estaven a nivell de *baseline* i 24 (6,88%) estaven sobrerregulats més de 2 vegades (Fig10 i Taula 3).

Dels 334 gens, en varem trobar 109 d'infrarregulats (32,63%) (Fig11 i Taula 4).

Dels 334 gens amb expressió diferencial significativa, els processos biològics més representats van ser (Fig9):

- Metabolisme [36 gens, (10,78%)]
- Transcripció [32 gens, (9,58%)]
- Transport [29 gens, (8,68%)]
- Senyalització [27 gens, 8,08%]
- Desenvolupament del sistema nerviós [25 gens, [7,48%]]
- Resposta immunitària [23 gens, (6,89%)]
- Adhesió cel·lular [15 gens, (4,49%)]
- Apoptosi [9 gens, (2,69%)]
- Matriu extracel·lular [8 gens, [2,40%]]
- Resposta a substàncies orgàniques [7 gens, (2,10%)]
- Proliferació cel·lular [5 gens, (1,5%)]
- Diferenciació cel·lular [4 gens, (1,20%)]
- Pigmentació [4 gens, (1,20%)]
- Transmissió sinàptica [3 gens, (0,90%)]
- Transducció de senyals [3 gens, (0,90%)]

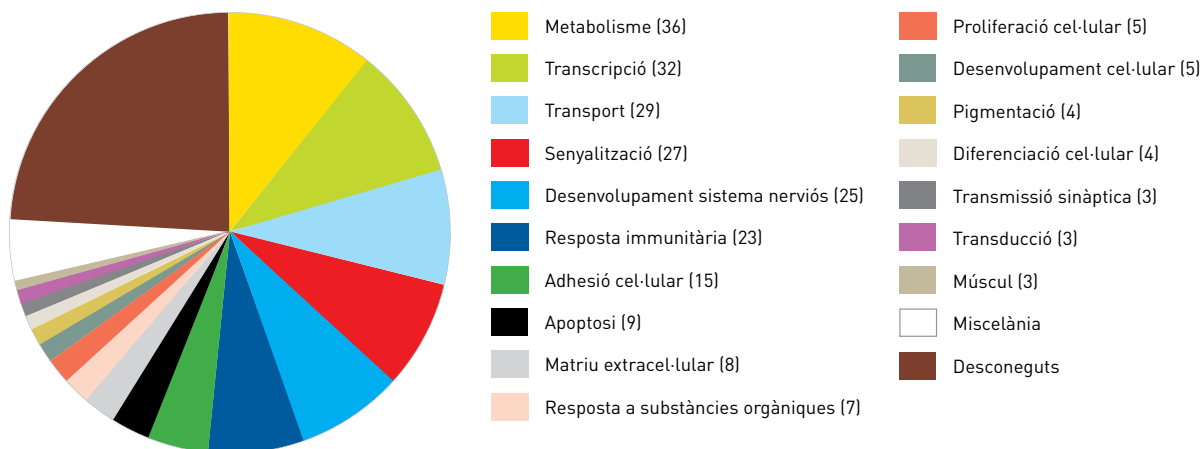


Figura 9. Processos biològics de *Gene Ontology* (GO) dels 334 gens amb expressió diferencial significativa en els GAD de la comparació de les extremitats no lesionades dels Tg-STZ vs les extremitats no lesionades dels ICR. (n= nombre de gens per categoria).

També es varen estudiar les categories funcionals dels 24 gens sobrerregulats més de dues vegades, van ser (Fig10):

- Metabolisme [5 gens, (21,7459)]
- Transcripció [3 gens, (13,04%)] relacionats principalment en processos d'inhibició de la transcripció de proteïnes.
- Senyalització [2 gens, (8,67%)]
- Desenvolupament del sistema nerviós [2 gens, (8,67%)]

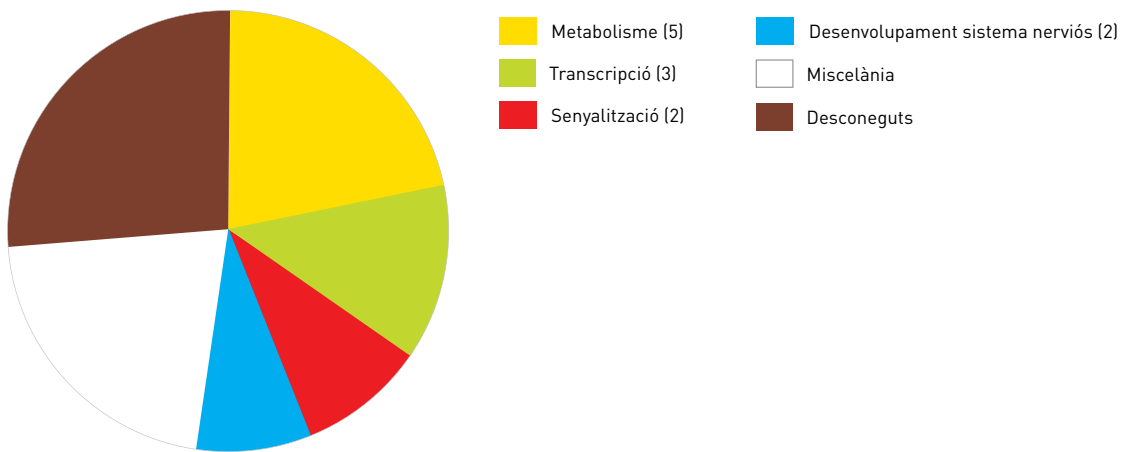


Figura 10. Processos biològics de *Gene Ontology* (GO) dels 24 gens sobrerregulats més de dues vegades en els GAD de la comparació de les extremitats no lesionades dels Tg-STZ vs les extremitats no lesionades dels ICR. (n= nombre de gens per categoria).

Dels 109 gens infrarregulats amb expressió diferencial significativa, els processos biològics més representats corresponien (Fig11):

- Transport [16 gens, (14,68%)]
- Desenvolupament del sistema nerviós [10 gens, (9,17%)]
- Transcripció [8 gens, (7,34%)]
- Senyalització [7 gens, (6,42%)]
- Metabolisme [6 gens, (5,50%)]
- Apoptosi [5 gens, (4,59%)]
- Pigmentació [4 gens, (3,67%)]
- Resposta immunitària [3 gens, (2,75%)]
- Desenvolupament cel·lular [2 gens, (1,83%)]
- Diferenciació cel·lular [2 gens, (1,83%)]
- Transmissió sinàptica [2 gens, (1,83%)]
- Transducció de senyals [2 gens, (1,83%)]

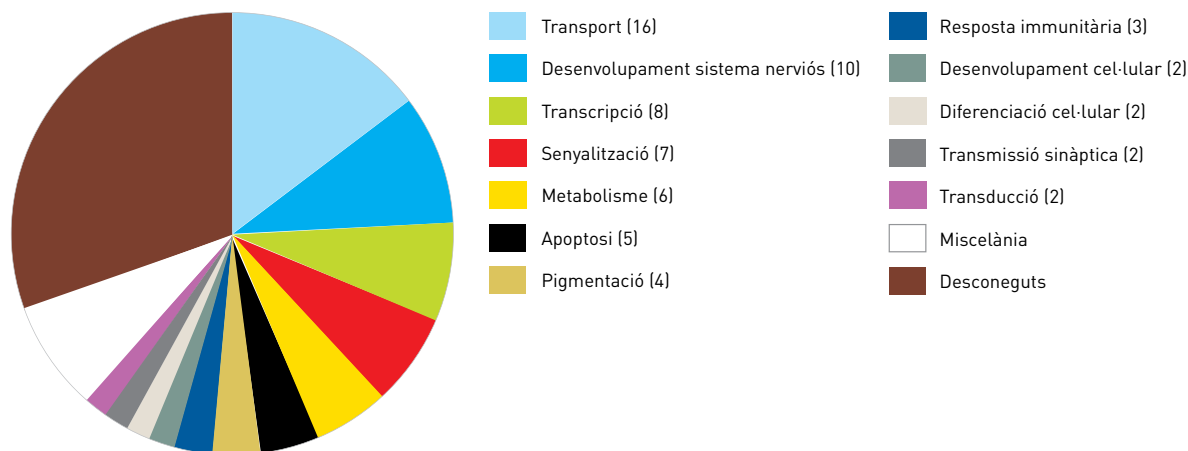
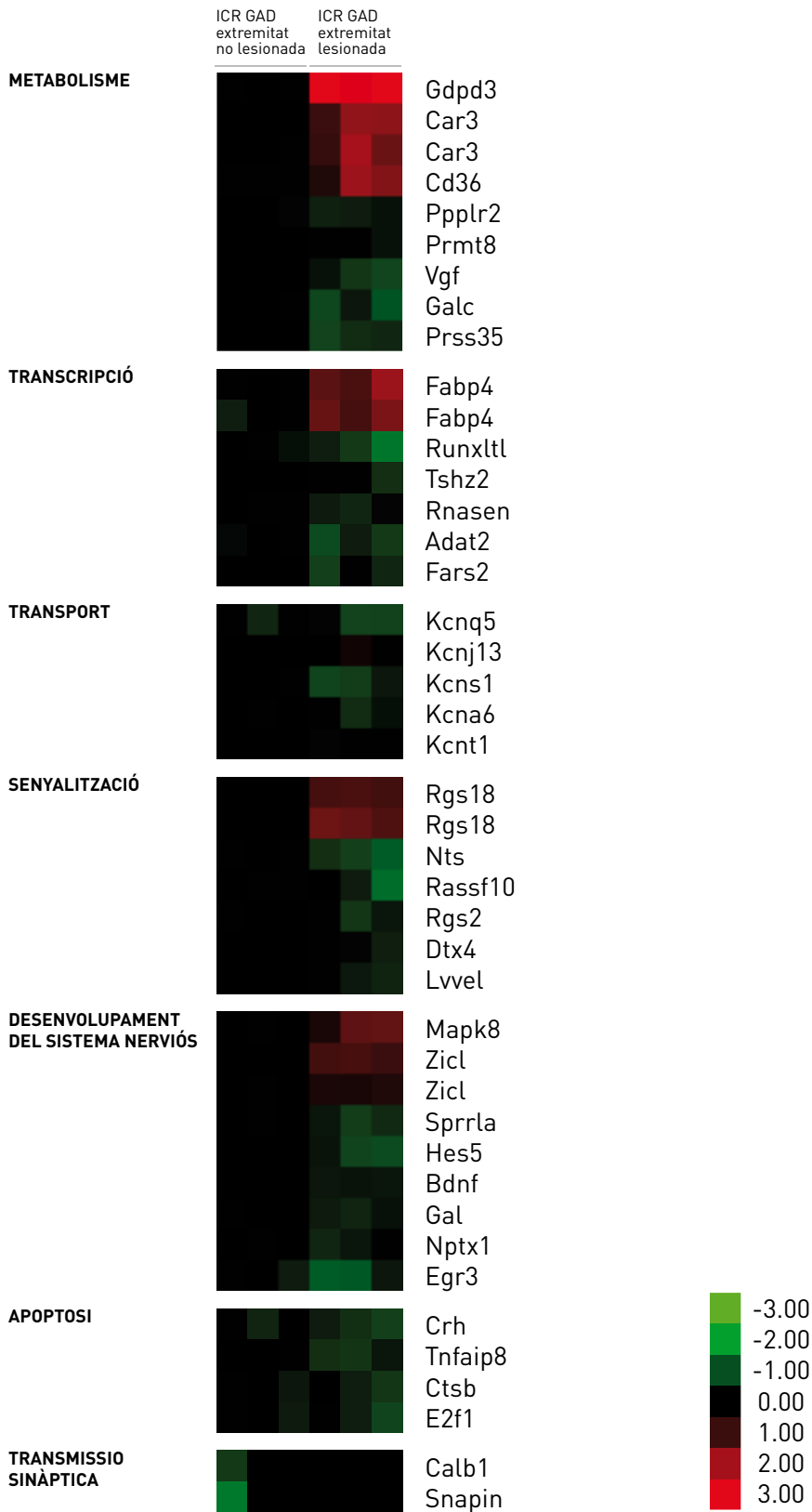


Figura 11. Processos biològics de *Gene Ontology* (GO) dels 109 gens infrarregulats en la comparació de les extremitats no lesionades dels Tg-STZ vs les extremitats no lesionades dels ICR. (n= nombre de gens per categoria).

L'anàlisi amb *Clusters* va representar visualment els subgrups dels diferents gens sobreexpressats més de 2 vegades i infraexpressats i els seus patrons d'expressió (Fig12). Aquest anàlisi va demostrar que els gens expressats en els GAD de les extremitats no lesionades dels animals Tg-STZ vs les no lesionades dels animals ICR pertanyien a diferents termes de GO i no corresponien exclusivament a un únic procés de degeneració nerviosa en un procés de DM.

Figura 12. *Heatmap clustering* dels gens sobrerregulats més de dues vegades o dels infrarregulats dels GAD de les extremitats no lesionades dels animals Tg-STZ vs les extremitats no lesionades dels animals ICR.



Gens relacionats amb el transport de proteïnes i amb el transport a través de canals iònics apareixien infrarregulats com:

- Gens que codificaven per canals de potassi com *K⁺ voltage-gated channel, subfamily S, 1* (Kcns1), *potassium voltage-gated channel, shaker-related, subfamily, member 6* (Kcna6), *potassium voltage-gated channel, subfamily Q, member 5* (Kcnq5), *potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 13* (Kcnj13) o *potassium channel, subfamily T, member 1* (Kcnt1).

Gens relacionats amb el desenvolupament del sistema nerviós apareixien infrarregulats com:

- La galanina (Gal), *brain derived neurotrophic factor* (Bdnf), *early growth response 3* (Egr3) o *hairy and enhancer of split 5* (Hes5).
- Associats processos de regeneració axonal com *small proline-rich protein 1A* (Sprr1a), *neuronal pentraxin 1* (Nptx1) i *leucine rich repeat and Ig domain containing 1* (Lingo1).
- similar to *Zic protein; zinc finger protein of the cerebellum 1* (Zic1) i *mitogen-activated protein kinase 8* (Mapk1), per contra, es trobaven sobrerregulats.

Gens de processos de transcripció com:

- *Phenylalanine-tRNA synthetase 2* (Fars2), *runt-related transcription factor 1; translocated to, 1 (cyclin D-related)* (Runx1t1), *adenosine deaminase, tRNA-specific 2, TAD2 homolog* (Adat2), *teashirt zinc finger family member 2* (Tshz2) o *ribonuclease III, nuclear* (Rnasen) també tenien disminuïda la seva expressió.
- Gen inhibidor de processos de transcripció que es trobava sobreexpressat 2,80 vegades *Fatty acid binding protein 4, adipocyte f* (Fabp4).

Gens relacionats amb vies de senyalització cel·lular o de transducció de senyals com:

- Neurotensina (Nts), *lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1 (Lyve)*, *deltex 4 homolog (Dtx4)*, *Ras association (RalGDS/AF-6) domain family (N-terminal) member 10 (Rassf10)* o *regulator of G-protein signaling 2 (Rgs2)* eren gens infrarregulats.
- *Regulator of G-protein signaling 18 (Rgs18)*, també associat a proteïna G, es trobava lleugerament sobrerregulat.

Gens associats amb la transmissió sinàptica *SNAP-associated protein (Snapin)* i *calbindin 1 (Calb1)* estaven infrarregulats.

Gens associats a metabolisme com:

- *Protease, serine, 35 (Prss35)*; *protein arginine N-methyltransferase 8 (Prmt8)*, *phosphatidylserine decarboxylase (Psid)*; *galactosylceramidase (Galc)* i *predicted gene 5490*; *protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 2*; *predicted gene 2780*; *predicted gene 7749*; *predicted gene 2802*; *hypothetical protein (Ppp1r2)* estaven infrarregulats.
- Gen inductor de factors de creixement nerviosos que també pot generar metabòlits precursors i energia o influir en la secreció d'insulina també estava infrarregulat *Nerve growth factor inducible (Vgf)*.
- Metabolisme dels hidrats de carboni, *Carbonic anhydrase 3 (Car3)* i, metabolisme lipídic *glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 3 (Gdpd3)* i *CD36 antigen (Cd36)* van ser gens relacionats amb processos metabòlics que estaven marcadament sobrerregulats.

Gens associats a apoptosi com:

- *tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8* (Tfnaip) que és proapoptòtic, *cathepsin B* (Ctsb), *E2F transcription factor 1* (E2f1) o Crh que és neuroprotector es trobaven infrarregulats.

Gens relacionats amb la diferenciació cel·lular, *v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein F* (Maff) i *pregnancy-associated plasma protein A* (Pappa), estaven infrarregulats.

Gens associats a processos com la matriu extracel·lular i en mecanismes d'adhesió cel·lular, apareixien expressats a nivell de *baseline*.

Taula 3. Gens sobrerregulats ≥ 2 vegades en els GAD de les extremitats no lesionades dels animals Tg-STZ comparat amb les extremitats no lesionades dels ICR amb un P-value < 0.01 . Les columnes mostren (d'esquerra a dreta) la identificació d'*Affymetrix* (*Affymetrix ID*), símbol del gen, nom del gen, la mitjana del FC de cada gen, els valors en parèntesis representen la desviació estàndard (SD), i el p-valor utilitzant el mètode de *Benjamini i Hochberg*.

Affymetrix ID	Símbol del gen	Nom del gen	FC de ICR GAD extremitat lesionada (FC)	P-valor
1435710_at	Al661384	expressed sequence Al661384	2,86 (0,46)	2,6E-06
1449434_at	Car3	carbonic anhydrase 3	2,95 (0,83)	1,1E-03
1460256_at	Car3	carbonic anhydrase 3	2,90 (1,07)	5,0E-03
1450883_a_at	Cd36	CD36 antigen	2,91 (1,03)	4,8E-03
1417867_at	Cfd	complement factor D (adipsin)	2,70 (0,70)	5,9E-03
1439332_at	Ddit4l	DNA-damage-inducible transcript 4-like	2,00 (0,69)	5,1E-03
1417023_a_at	Fabp4	fatty acid binding protein 4, adipocyte	2,59 (0,43)	8,0E-03
1451263_a_at	Fabp4	fatty acid binding protein 4, adipocyte	2,80 (0,82)	4,6E-03
1437685_x_at	Fmod	fibromodulin	2,01 (0,30)	7,4E-04
1437718_x_at	Fmod	fibromodulin	2,17 (0,39)	3,1E-04
1456084_x_at	Fmod	fibromodulin	2,85 (0,45)	2,5E-05
1421190_at	Gabbr3	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit beta 3	2,04 (0,68)	3,3E-04
1449526_a_at	Gdpd3	glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 3	8,13 (1,46)	9,0E-13
1421551_s_at	Ifi202b	interferon activated gene 202B	2,08 (0,38)	1,5E-05
1457936_at	Mapk8	mitogen-activated protein kinase 8	2,27 (0,47)	4,3E-06
1421317_x_at	Myb	myeloblastosis oncogene	2,25 (1,48)	7,6E-03
1421811_at	NA	thrombospondin 1; similar to thrombospondin 1	2,54 (0,67)	1,7E-05
1442893_at	NA	leucine rich repeat transmembrane neuronal 1	2,15 (0,54)	9,7E-04
1437060_at	Olfm4	olfactomedin 4	2,38 (1,76)	6,1E-03
1417273_at	Pdk4	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4	2,81 (1,01)	9,5E-03
1420398_at	Rgs18	regulator of G-protein signaling 18	2,54 (0,24)	1,3E-05
1449856_at	Rgs18	regulator of G-protein signaling 18	2,15 (0,07)	4,7E-05
1427221_at	Slc6a20a	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 20A	2,64 (0,83)	8,4E-04
1439627_at	Zic1	similar to Zic protein; zinc finger protein of the cerebellum 1	2,09 (0,09)	4,1E-06

Taula 4. Gens infrarregulats, expressats <1 vegades en els GAD de les extremitats no lesionades dels animals Tg-STZ comparat amb les extremitats no lesionades dels animals ICR amb un P-value < 0.01. Les columnes mostren (d'esquerra a dreta) la identificació d'*Affymetrix* (*Affymetrix ID*), símbol del gen, nom del gen, la mitjana del FC de cada gen, els valors en parèntesis representen la desviació estàndard (DS) i el p-valor utilitzant el mètode de *Benjamini i Hochberg*.

Affymetrix ID	Símbol del gen	Nom del gen	FC de Tg-STZ GAD extremitat no lesionada (DS)	P-valor
1439509_at	2900008C10Rik	RIKEN cDNA 2900008C10 gene	0,73 (0,07)	9,1E-03
1436444_at	6030405A18Rik	RIKEN cDNA 6030405A18 gene	0,59 (0,05)	4,6E-05
1444723_at	6530418L21Rik	RIKEN cDNA 6530418L21 gene	0,66 (0,21)	4,1E-03
1454056_at	9030407P20Rik	RIKEN cDNA 9030407P20 gene	0,72 (0,07)	3,3E-03
1457523_at	9530056K15Rik	RIKEN cDNA 9530056K15 gene	0,68 (0,08)	2,0E-03
1459083_at	A330084C13Rik	RIKEN cDNA A330084C13 gene	0,60 (0,04)	1,4E-04
1419130_at	Adat2	adenosine deaminase, tRNA-specific 2, TAD2 homolog (S. cerevisiae)	0,59 (0,08)	1,9E-03
1439483_at	Al506816	expressed sequence Al506816	0,65 (0,08)	2,3E-03
1457990_at	Anks1b	ankyrin repeat and sterile alpha motif domain containing 1B	0,63 (0,07)	6,4E-05
1444974_at	AU023617	expressed sequence AU023617	0,66 (0,01)	1,8E-03
1441151_at	AU044157	expressed sequence AU044157	0,75 (0,09)	3,7E-03
1422168_a_at	Bdnf	brain derived neurotrophic factor	0,70 (0,01)	2,3E-03
1456934_at	Calb1	calbindin 1	0,64 (0,14)	5,6E-03
1457984_at	Crh	corticotropin releasing hormone	0,61 (0,06)	3,9E-03
1418097_a_at	Crlf2	cytokine receptor-like factor 2	0,73 (0,07)	7,0E-03
1422141_s_at	Csprs	similar to putative G-protein coupled receptor; predicted gene 2635; component of Sp100-rs; predicted gene 2666; predicted gene 7582; predicted gene 7592; predicted gene 7609	0,51 (0,20)	3,4E-03
1435792_at	Csprs Gm 7582	similar to putative G-protein coupled receptor; predicted gene 2635; component of Sp100-rs; predicted gene 2666; predicted gene 7582; predicted gene 7592; predicted gene 7609	0,41 (0,31)	3,8E-03
1417491_at	Ctsb	cathepsin B	0,73 (0,19)	8,3E-03
1438211_s_at	Dbp	D site albumin promoter binding protein	0,65 (0,08)	2,1E-03
1436659_at	Dclk1	doublecortin-like kinase 1	0,73(0,03)	8,1E-03
1435681_s_at	Ddx49	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 49	0,73 (0,14)	2,9E-03
1416755_at	Dnajb1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1	0,71 (0,10)	3,3E-03
1436545_at	Dtx4	deltex 4 homolog (Drosophila)	0,74 (0,06)	9,5E-03
1417878_at	E2f1	E2F transcription factor 1	0,66 (0,11)	5,5E-03
1449044_at	Eef1e1	eukaryotic translation elongation factor 1 epsilon 1	0,73 (0,03)	9,3E-03
1437478_s_at	Efhd2	similar to EF hand domain containing 2; EF hand domain containing 2	0,48 (0,20)	1,0E-03
1436329_at	Egr3	early growth response 3	0,54 (0,17)	1,8E-03
1439406_x_at	Fars2	phenylalanine-tRNA synthetase 2 (mitochondrial)	0,67 (0,13)	2,2E-03
1452267_at	Flywch1	FLYWCH-type zinc finger 1	0,76 (0,12)	7,2E-03
1435115_at	Fndc5	fibronectin type III domain containing 5	0,74 (0,06)	3,6E-03
1460668_at	Gal	galanin	0,68 (0,03)	1,6E-03

Affymetrix ID	Símbol del gen	Nom del gen	FC de Tg-STZ GAD extremitat no lesionada (DS)	P-valor
1452907_at	Galc	galactosylceramidase	0,57 (0,11)	2,6E-04
1442379_at	Gm6041	predicted gene 6041	0,72 (0,19)	3,6E-03
1443997_at	Gprin2	G protein regulated inducer of neurite outgrowth 2	0,71 (0,04)	1,1E-03
1418917_at	Hebp2	heme binding protein 2	0,60 (0,03)	3,8E-05
1456010_x_at	Hes5	hairy and enhancer of split 5 (Drosophila)	0,58 (0,11)	7,6E-04
1422155_at	Hist2h3c2	histone cluster 2, H3b; histone cluster 1, H3f; histone cluster 1, H3e; histone cluster 2, H3c1; histone cluster 1, H3d; histone cluster 1, H3c; histone cluster 1, H3b; histone cluster 2, H3c2; histone cluster 2, H2aa1; histone cluster 2, H2aa2	0,63 (0,05)	1,8E-03
1452388_at	Hspa1a	heat shock protein 1B; heat shock protein 1A; heat shock protein 1-like	0,72 (0,12)	7,5E-03
1423566_a_at	Hsph1	heat shock 105kDa/110kDa protein 1	0,69 (0,27)	9,7E-03
1418268_at	Htr3a	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3A	0,74 (0,03)	7,7E-03
1455865_at	Insm1	insulinoma-associated 1	0,70 (0,08)	8,8E-04
1443793_x_at	Ints1	integrator complex subunit 1	0,61 (0,07)	4,3E-04
1440557_at	Ipw	imprinted gene in the Prader-Willi syndrome region	0,50 (0,06)	1,6E-06
1441049_at	Kcna6	potassium voltage-gated channel, shaker-related, subfamily, member 6	0,70 (0,08)	7,0E-03
1441071_at	Kcnq5	potassium voltage-gated channel, subfamily Q, member 5	0,61 (0,12)	6,4E-03
1421518_at	Kcns1	K+ voltage-gated channel, subfamily S, 1	0,60 (0,08)	2,8E-04
1458428_at	Kcnt1	potassium channel, subfamily T, member 1	0,79 (0,02)	6,4E-03
1437386_at	Lingo1	leucine rich repeat and Ig domain containing 1	0,76 (0,10)	9,4E-03
1455883_a_at	Lrrtm1	leucine rich repeat transmembrane neuronal 1	0,69 (0,01)	5,1E-03
1422903_at	Ly86	lymphocyte antigen 86	0,34 (0,05)	3,7E-05
1429379_at	Lyve1	lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1	0,73 (0,10)	4,5E-03
1418936_at	Maff	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein F (avian)	0,75 (0,03)	7,5E-03
1457277_at	Mblac1	metallo-beta-lactamase domain containing 1	0,74 (0,03)	8,0E-03
1427101_at	Metrn	meteorin, glial cell differentiation regulator	0,75 (0,08)	8,5E-03
1434322_at	Micall2	MICAL-like 2	0,69 (0,09)	3,2E-03
1448139_at	Mlc1	megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts 1 homolog (human)	0,72 (0,03)	4,4E-03
1438654_x_at	Mmd2	monocyte to macrophage differentiation-associated 2	0,73 (0,08)	8,7E-03
1419362_at	Mrpl35	mitochondrial ribosomal protein L35	0,72 (0,11)	3,7E-03
1440989_at	Mrpl35	mitochondrial ribosomal protein L35	0,71 (0,03)	4,8E-03
1421184_a_at	NA	HIG1 domain family, member 1C; UbiE-YGHL1 fusion protein; methyltransferase like 7A2	0,63 (0,04)	2,7E-04
1428037_at	NA	similar to otoancorin	0,70 (0,10)	3,9E-03

Affymetrix ID	Símbol del gen	Nom del gen	FC de Tg-STZ GAD extremitat no lesionada (DS)	P-valor
1436246_at	NA		0,74 (0,06)	5,6E-03
1438783_at	NA	prostate transmembrane protein, androgen induced 1; similar to Nedd4 WW binding protein 4	0,71 (0,11)	4,5E-03
1439113_at	NA	similar to development and differentiation enhancing factor 2	0,72 (0,03)	1,8E-03
1443643_at	NA		0,62 (0,20)	7,8E-03
1444020_at	NA	neurocan; similar to Neurocan	0,63 (0,17)	6,6E-03
1446050_at	NA	membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing 1	0,57 (0,16)	8,0E-04
1446514_at	NA	dipeptidylpeptidase 10	0,64 (0,08)	6,1E-03
1451858_at	NA	MAS-related GPR, member A2; similar to Mrgpra2 protein	0,48 (0,11)	1,2E-05
1455715_at	NA	hypothetical LOC100038746	0,40 (0,04)	2,0E-06
1455869_at	NA	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, beta	0,35 (0,03)	2,7E-03
1434877_at	Nptx1	neuronal pentraxin 1	0,72 (0,09)	5,0E-03
1422860_at	Nts	neurotensin	0,54 (0,08)	7,8E-04
1456974_at	Onecut1	one cut domain, family member 1	0,73 (0,11)	6,2E-03
1424989_at	Orai1	ORAI calcium release-activated calcium modulator 1	0,73 (0,13)	3,6E-03
1427633_a_at	Pappa	pregnancy-associated plasma protein A	0,71 (0,11)	8,8E-04
1453147_at	Polr3e	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide E	0,72 (0,07)	7,4E-03
1422753_a_at	Polr3k	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide K	0,70 (0,16)	4,7E-03
1456830_at	Ppp1r2	predicted gene 5490; protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 2; predicted gene 2780; predicted gene 7749; predicted gene 2802; hypothetical protein LOC639433	0,68 (0,03)	9,4E-03
1435204_at	Prmt8	protein arginine N-methyltransferase 8	0,75 (0,04)	3,5E-03
1434195_at	Prss35	protease, serine, 35	0,60 (0,06)	1,2E-04
1435425_at	Psid	phosphatidylserine decarboxylase	0,76 (0,06)	8,5E-03
1429123_at	Rab27a	RAB27A, member RAS oncogene family	0,68 (0,21)	3,5E-03
1433947_at	Rab37	RAB37, member of RAS oncogene family	0,72 (0,06)	3,5E-03
1457140_s_at	Rassf10	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family (N-terminal) member 10	0,67 (0,27)	7,8E-03
1447830_s_at	Rgs2	regulator of G-protein signaling 2	0,70 (0,11)	7,1E-04
1458707_at	RIKEN cDNA E430016F16 gene	RIKEN cDNA E430016F16 gene	0,76 (0,04)	5,6E-03
1418310_a_at	Rlbp1	retinaldehyde binding protein 1	0,72 (0,10)	6,1E-03
1438505_s_at	Rnasen	ribonuclease III, nuclear	0,69 (0,06)	1,2E-03
1440310_at	Runx1t1	runt-related transcription factor 1; translocated to, 1 (cyclin D-related)	0,54 (0,15)	2,5E-04
1417600_at	Slc15a2	solute carrier family 15 (H+/peptide transporter), member 2	0,63 (0,07)	7,1E-03

Affymetrix ID	Símbol del gen	Nom del gen	FC de Tg-STZ GAD extremitat no lesionada (DS)	P-valor
1424730_a_at	Slc15a2	solute carrier family 15 (H+/peptide transporter), member 2	0,53 (0,13)	4,3E-04
1447808_s_at	Slc15a2	solute carrier family 15 (H+/peptide transporter), member 2	0,41 (0,08)	6,1E-06
1426578_s_at	Snapin	SNAP-associated protein	0,75 (0,10)	8,3E-03
1431055_a_at	Snx10	sorting nexin 10	0,74 (0,04)	5,1E-03
1424031_at	Snx11	sorting nexin 11	0,74 (0,04)	7,8E-03
1449133_at	Sprr1a	small proline-rich protein 1A	0,63 (0,07)	7,9E-03
1419632_at	Tecta	tectorin alpha	0,72 (0,08)	8,0E-03
1453268_at	Thg1l	tRNA-histidine guanylyltransferase 1-like [<i>S. cerevisiae</i>]	0,71 (0,10)	9,2E-03
1416950_at	Tnfaip8	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8	0,63 (0,05)	1,3E-03
1443392_at	Trpv1	transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1	0,68 (0,07)	2,2E-03
1428026_at	Tshz2	teashirt zinc finger family member 2	0,75 (0,12)	5,2E-03
1420018_s_at	Tspan8	tetraspanin 8	0,69 (0,21)	9,6E-03
1422695_at	Ttyh1	tweety homolog 1 [<i>Drosophila</i>]	0,69 (0,12)	2,4E-03
1415861_at	Tyrp1	tyrosinase-related protein 1	0,36 (0,07)	3,8E-08
1415862_at	Tyrp1	tyrosinase-related protein 1	0,43 (0,11)	8,4E-06
1439409_x_at	Tyrp1	tyrosinase-related protein 1	0,45 (0,01)	6,1E-07
1436094_at	Vgf	VGF nerve growth factor inducible	0,61 (0,09)	1,8E-05
1426417_at	Yipf4	Yip1 domain family, member 4	0,59 (0,12)	4,5E-05

5. III. ANÀLISI COMPARATIU: TG-STZ LESIONADES VS ICR LESIONADES

L'anàlisi de l'expressió gènica dels GAD de les extremitats lesionades dels animals Tg-STZ vs les extremitats lesionades dels animals ICR es va dur a terme per determinar si el model d'animals Tg-STZ mostrava signes de regeneració nerviosa 4 setmanes després d'una lesió per aixafament del nervi ciàtic, un cop instaurat un procés diabètic de 8 setmanes de duració.

A l'avaluar l'expressió gènica diferencial dels GAD de les extremitats lesionades dels animals Tg-STZ comparada amb l'expressió gènica dels GAD de les extremitats lesionades dels animals ICR es van detectar 340 gens amb expressió diferencial (Fig13).

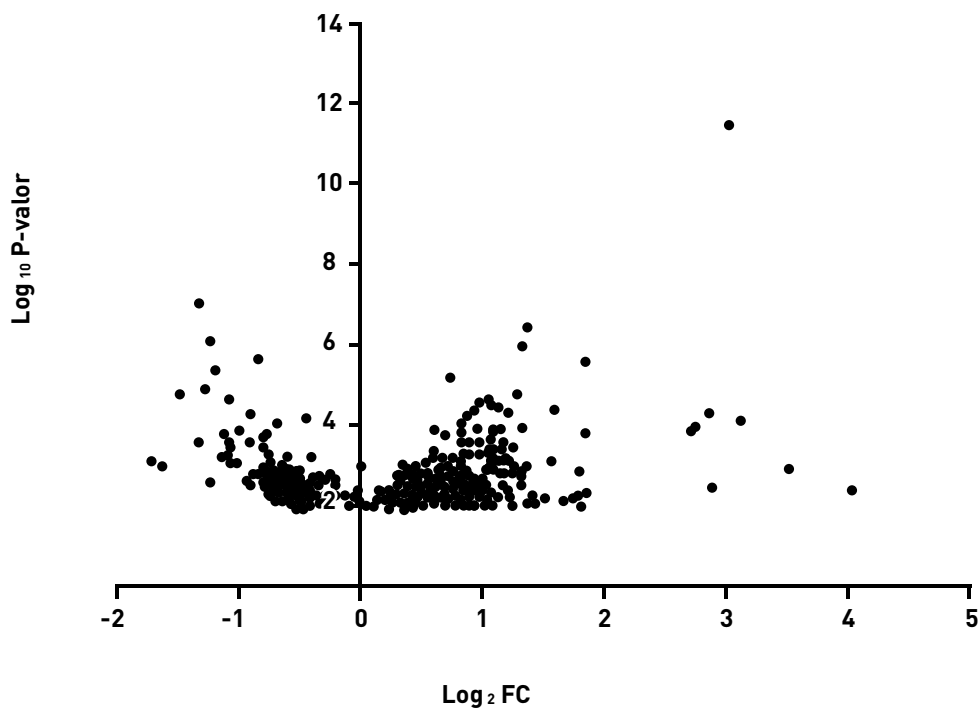


Figura 13. *Volcano plot* dels 340 gens amb expressió diferencial dels GAD de les extremitats lesionades dels animals Tg-STZ vs les extremitats lesionades dels animals ICR. Els gens més sobrerregulats apareixen a la part dreta de la gràfica.

Dels 340 gens (Fig14), n'hi havia 244 de sobrerregulats (71,76%). Dels sobrerregulats, 202 gens (59,41%) estaven pràcticament a nivell de *baseline* i 42 gens (12,4%) estaven sobrerregulats més de 2 vegades (Fig15 i Taula 5). Dels 340 gens, n'hi havia 96 d'infrarregulats (28,2%) (Fig16 i Taula 6).

Dels 340 gens amb expressió diferencial significativa, els processos biològics més representats van ser (Fig14):

- Metabolisme [30 gens, (8,82%)]
- Transport [28 gens, (8,23%)]
- Desenvolupament del sistema nerviós [21 gens, (6,17%)]
- Transcripció [21 gens, (6,17%)]
- Senyalització [20 gens, (5,88%)]
- Resposta immunitària [19 gens, (5,59%)]
- Matriu extracel·lular [13 gens, (3,82%)]
- Apoptosi [8 gens, (2,36%)]
- Proliferació cel·lular [8 gens, (2,36%)]
- Desenvolupament cel·lular [8 gens, (2,36%)]
- Resposta a substàncies orgàniques [8 gens, (2,36%)]
- Transmissió sinàptica [8 gens, (2,36%)]
- Adhesió cel·lular [5 gens, (1,47%)]
- Migració cel·lular [5 gens, (1,47%)]
- Assemblatge del nucleosoma [4 gens, (1,17%)]
- Divisió cel·lular/cicle cel·lular [4 gens, (1,17%)]
- Pigmentació [3 gens, (0,88%)]

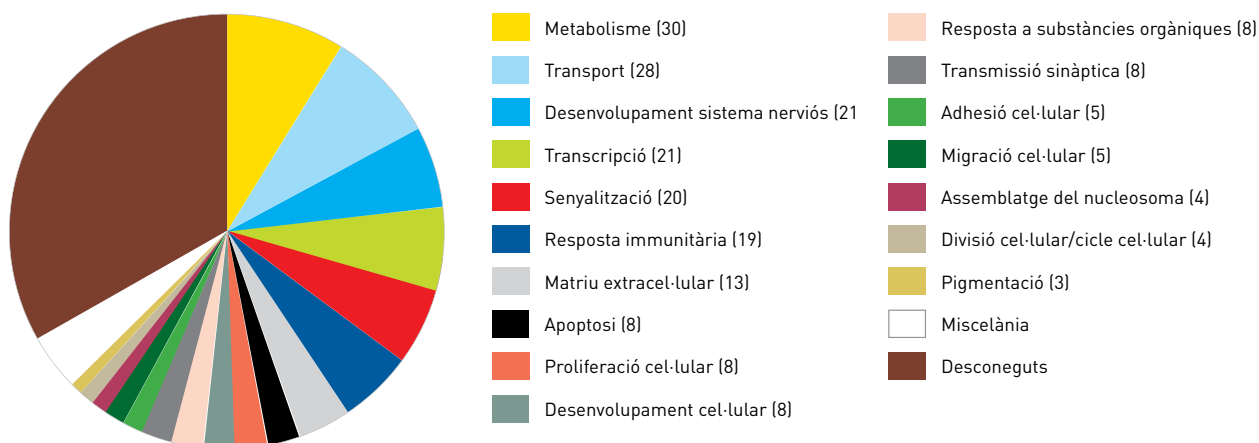


Figura 14. Processos biològics de *Gene Ontology* (GO) dels 340 gens amb expressió diferencial significativa en els GAD de les extremitats lesionades dels animals Tg-STZ vs les extremitats lesionades dels animals ICR. (n= nombre de gens per categoria).

Els 42 gens sobreexpressats més de 2 vegades de manera significativa estaven relacionats amb els següents processos biològics (Fig15):

- Desenvolupament del sistema nerviós [5 gens, (11,90%)]
- Senyalització cel·lular [5 gens, (11,90%)]
- Transmissió sinàptica [4 gens, (9,52%)]
- Resposta a substàncies orgàniques [4 gens, (9,52%)]
- Matriu extracel·lular [3 gens, (7,14%)]
- Transport [2 gens, (4,76%)]
- Resposta immunitària [2 gens, (4,76%)]

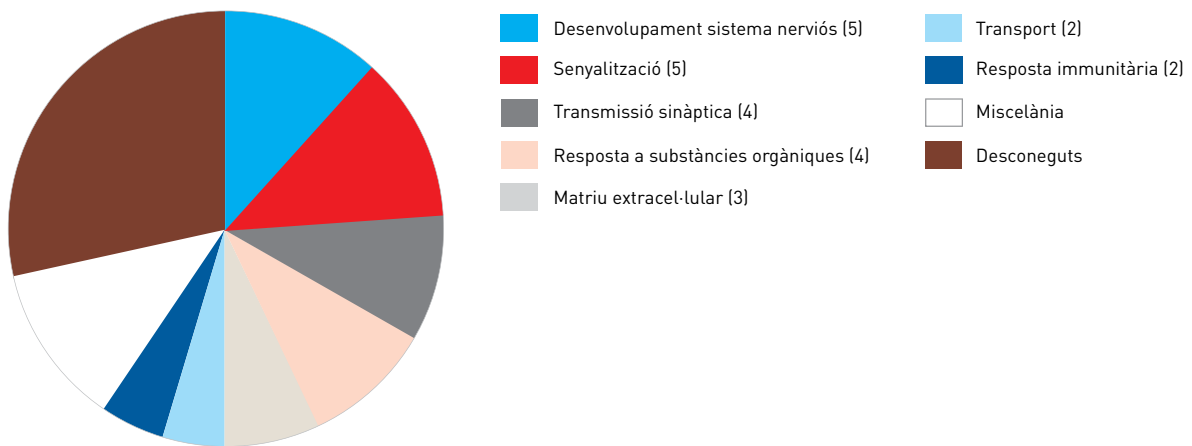


Figura 15. Processos biològics de *Gene Ontology* (GO) dels 42 gens sobreexpressats més de dues vegades en els GAD de les extremitats lesionades dels animals Tg-STZ vs les extremitats lesionades dels animals ICR. (n= nombre de gens per categoria).

Els 96 gens infrarregulats de manera significativa estaven relacionats amb el següents processos biològics (Fig16):

- Transport de substàncies [13 gens, (13,54%)]
- Desenvolupament del sistema nerviós [7gens, (7,29%)]
- Transcripció [6 gens, (6,25%)]
- Metabolisme [5 gens, (5,21%)]
- Senyalització [4 gens, (4,17%)]
- Proliferació cel·lular [4 gens, (4,17%)]
- Matriu extracel·lular [3 gens, (3,13%)]
- Assemblatge del nucleosoma [3 gens, (3,13%)]
- Pigmentació [3 gens, (3,13%)]
- Transcripció sinàptica [2 gens, (2,08%)]
- Adhesió cel·lular [2 gens, (2,08%)]

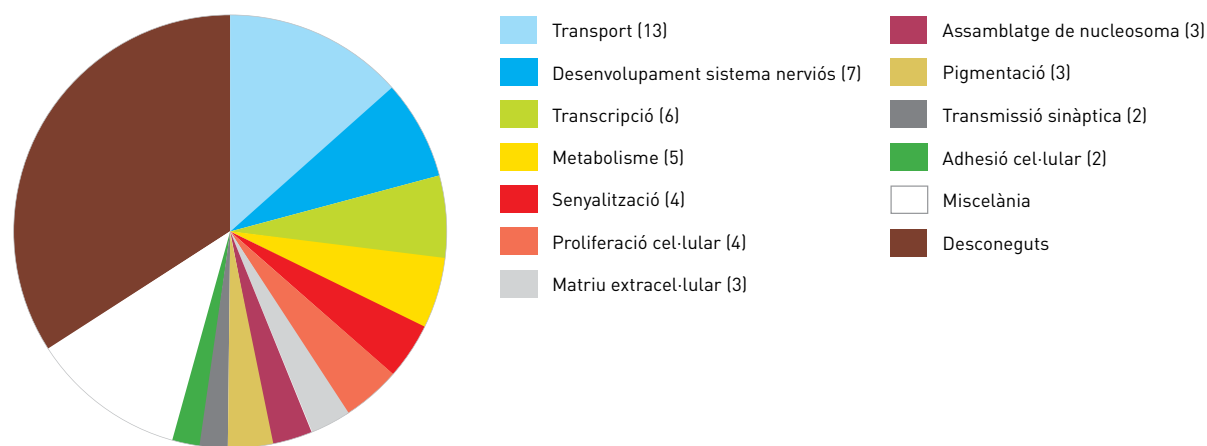
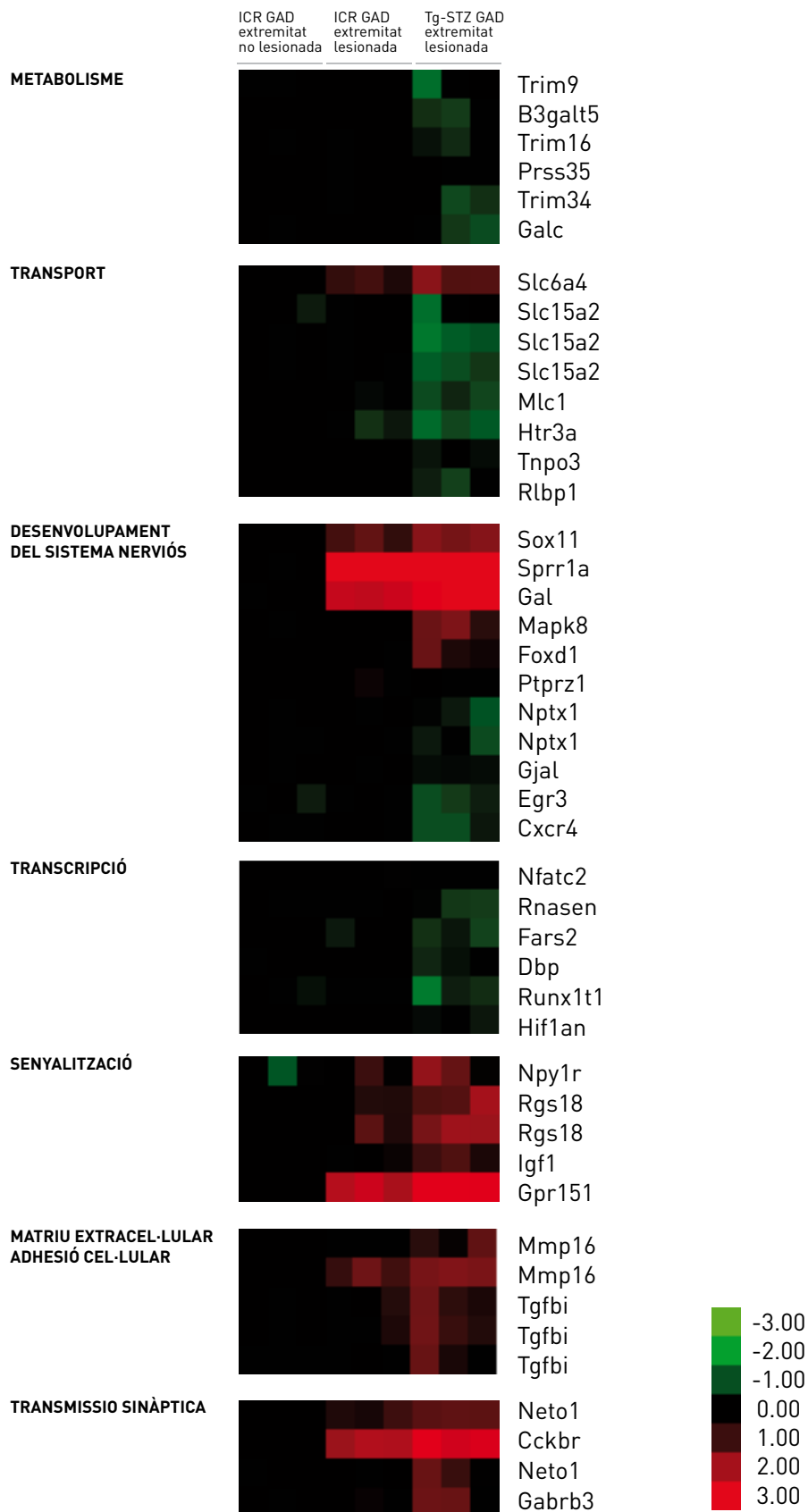


Figura 16. Processos biològics de *Gene Ontology* (GO) dels 96 gens infrarregulats en els GAD les extremitats lesionades dels animals Tg-STZ vs les extremitats lesionades dels animals ICR. (n= nombre de gens per categoria).

L'anàlisi amb *Clusters* va representar visualment els subgrups dels diferents gens sobreexpressats més de 2 vegades i infraexpressats i els seus patrons d'expressió (Fig17). Aquest anàlisi va demostrar que els gens expressats en els GAD de les extremitats lesionades dels animals Tg-STZ vs les lesionades dels animals ICR pertanyien a diferents termes de GO i no corresponien exclusivament a un únic procés de regeneració nerviosa en un procés de DM.

Figura 17. *Heatmap clustering* dels gens sobrerregulats més de dues vegades o dels infrarregulats dels GAD de les extremitats lesionades dels animals Tg-STZ vs les lesionades dels animals ICR.



El procés biològic amb més gens sobrerregulats més de 2 vegades en els GAD de les extremitats lesionades dels animals Tg-STZ vs les extremitats lesionades dels animals ICR va ser el desenvolupament dels sistema nerviós. Eren gens com (Fig18):

- Relacionat amb processos de guia de l'axó *Forkhead box D1* (Foxd1).
- Regeneració axonal *Small proline-rich protein 1a* (Sprr1a).
- Desenvolupament de les projeccions neuronals *Mitogen-activated protein kinase 8* (Mapk8).
- Gal amb FC de 8,57 en els animals Tg-STZ i amb un FC de 5,14 en els animals ICR.
- Sox11 amb FC de 3,12 en els animals Tg-STZ i amb un FC de 2,20 en els animals ICR.

En canvi, altres gens relacionats amb el desenvolupament dels sistema nerviós estaven infrarregulats en els animals Tg-STZ com (Fig19):

- *Chemokine (C-X-C motif) receptor 4* (Cxcr4) i *early growth response 3* (Egr3) que apareixien a nivell de *baseline* en les extremitats lesionades dels animals ICR.
- *Protein tyrosine phosphatase, receptor type Z, polypeptide 1* (Ptpnz1), *neuronal pentraxin* (Nptx), *neuronal pentraxin 1* (Nptx1), *gap junction protein, alpha 1* (Gja1), gens relacionats amb axogènesi i que en les extremitats lesionades dels animals ICR apareixien a nivell de *baseline*.

Gens associat a vies de senyalització estaven sobrerregulats, com (Fig18):

- Transmissió de senyals associats a proteïnes G Rgs18.
- Gen que codifica pel receptor de NPY *Neuropeptide Y receptor Y1* (Npy1r).
- Factor de creixement similar a la insulina *Insulin-like growth factor 1* (Igf1).
- Gpr151, en les extremitats lesionades dels animals ICR i dels Tg-STZ tenia un FC pròxim als nivells de *baseline*.

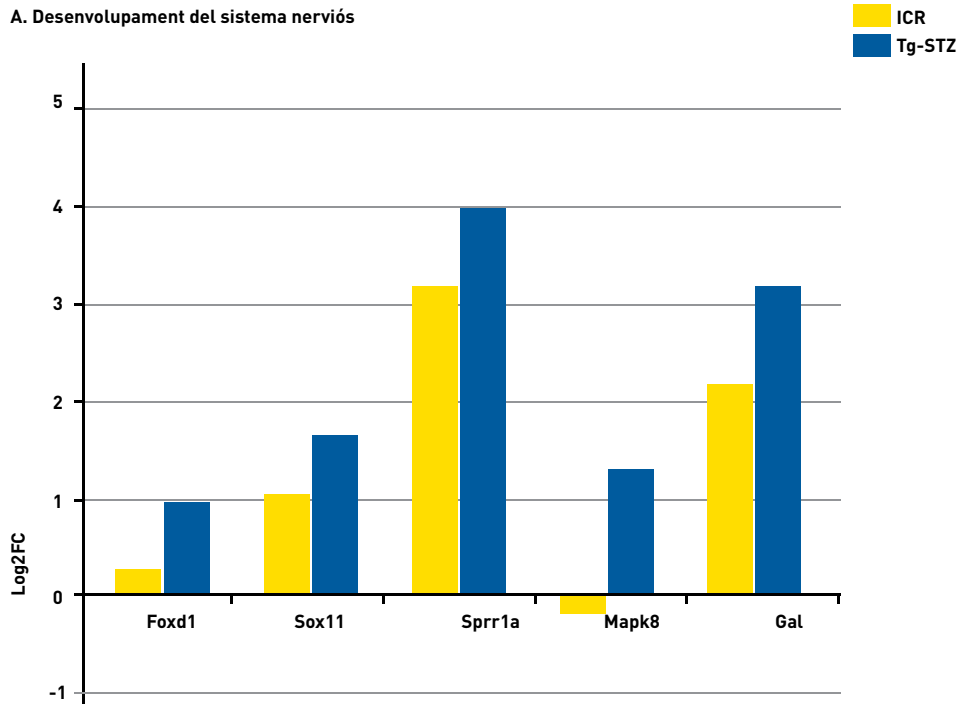
Gens de transmissió sinàptica com (Fig18):

- *Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit beta 3* (Gabbr3), *neuropilin (NRP) and tolloid (TLL)-like 1* (Neto1) estaven sobrerregulats més de 2 vegades en les extremitats lesionades dels animals Tg-STZ i en les extremitats lesionades dels ICR es trobaven a nivells de *baseline*.
- *Cholecystokinin B receptor* (Cckbr) que en les extremitats lesionades dels animals ICR tenia un FC de 4,16 i en les extremitats lesionades dels animals Tg-STZ de 6,43.

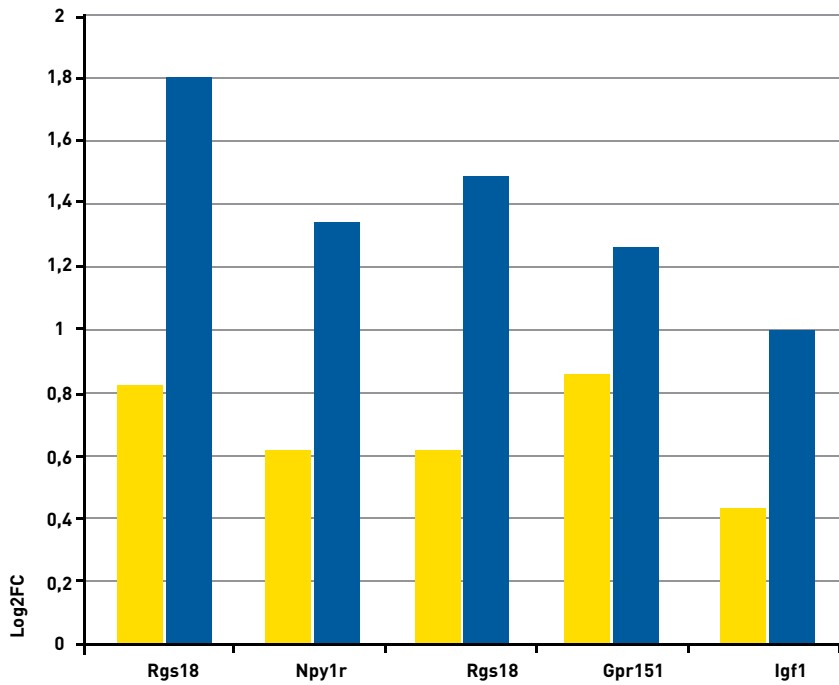
Gens associats amb la reorganització de la matriu extracel·lular i d'adhesió cel·lular sobrerregulats més de dues vegades (Fig18):

- *Transforming growth factor, beta induced* (Tgfbi).
- Associat també amb el catabolisme proteic *Matrix metalloproteinase 16* (Mmp16).

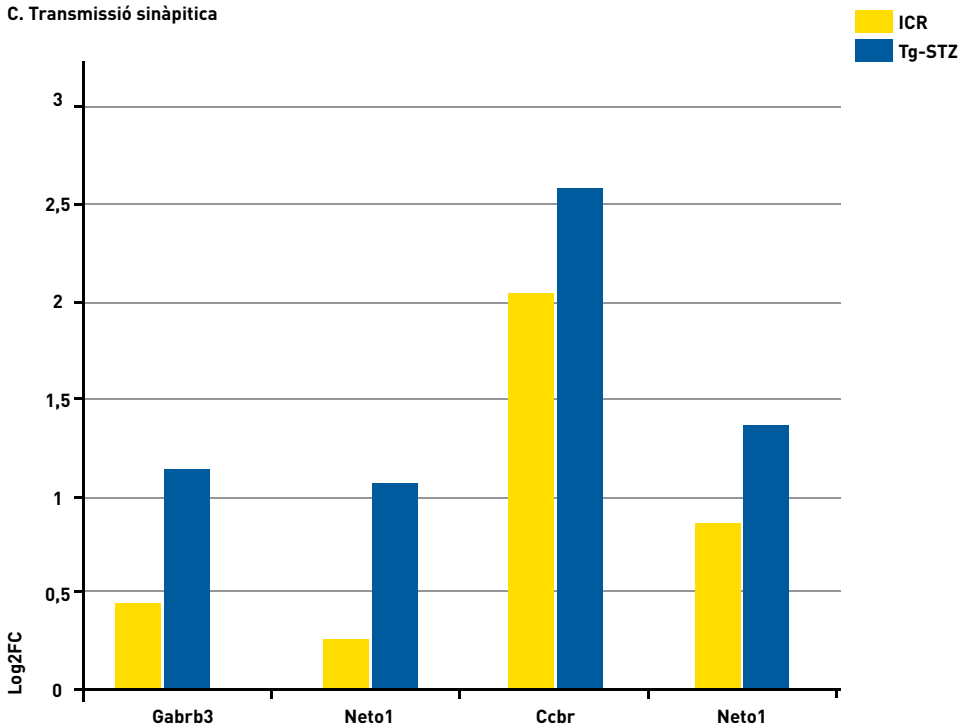
A. Desenvolupament del sistema nerviós



B. Senyalització



C. Transmissió sinàptica



D. Matriu extracel·lular

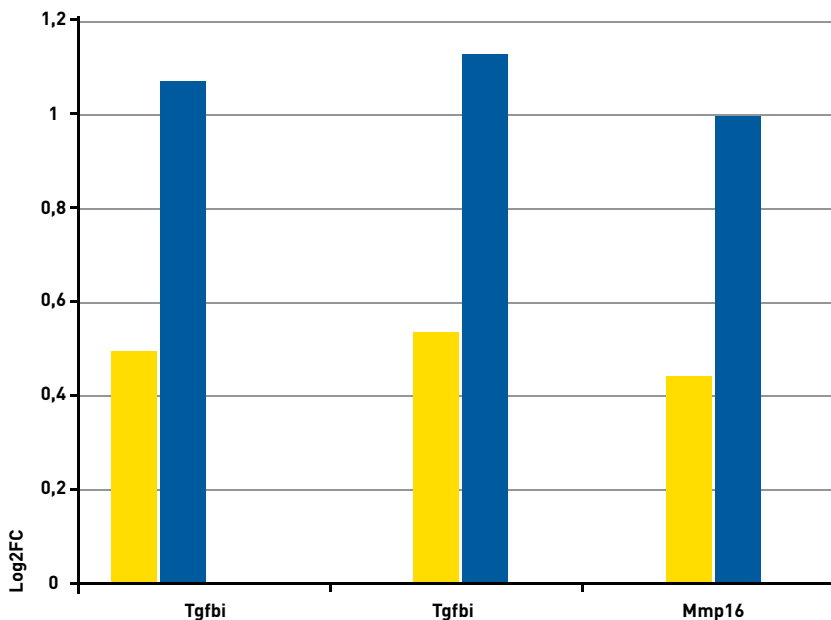


Figura 18. Expressió diferencial dels gens sobrerregulats dels GAD de les extremitats lesionades d'animals Tg-STZ i ICR. (A) Vies de desenvolupament del sistema nerviós; (B) Senyalització; (C) Transmissió sinàptica i (D) Matriu extracel·lular. Color blau: expressió gènica en els GAD de les extremitats lesionades dels animals Tg-STZ. Color groc: expressió gènica en els GAD de les extremitats lesionades dels animals ICR.

Gens associats amb el transport de substàncies:

- Slc6a apareixia sobrerregulat amb FC de 2,67 en les extremitats lesionades dels animals Tg-STZ i en les extremitats lesionades dels animals ICR a nivell de *baseline*.

Hi havia gens infrarregulats com (Fig19):

- *solute carrier family 15 (H⁺/peptide transporter), member 2* (Slc15a2), *5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3A* (Htr3a), *retinaldehyde binding protein 1* (Rlbp1), *Slc15a2, megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts 1 homolog (human)* (Mlc1) o *transportin 3* (Tnpo).
- Kcns1 o Kcna6, canals de potassi.

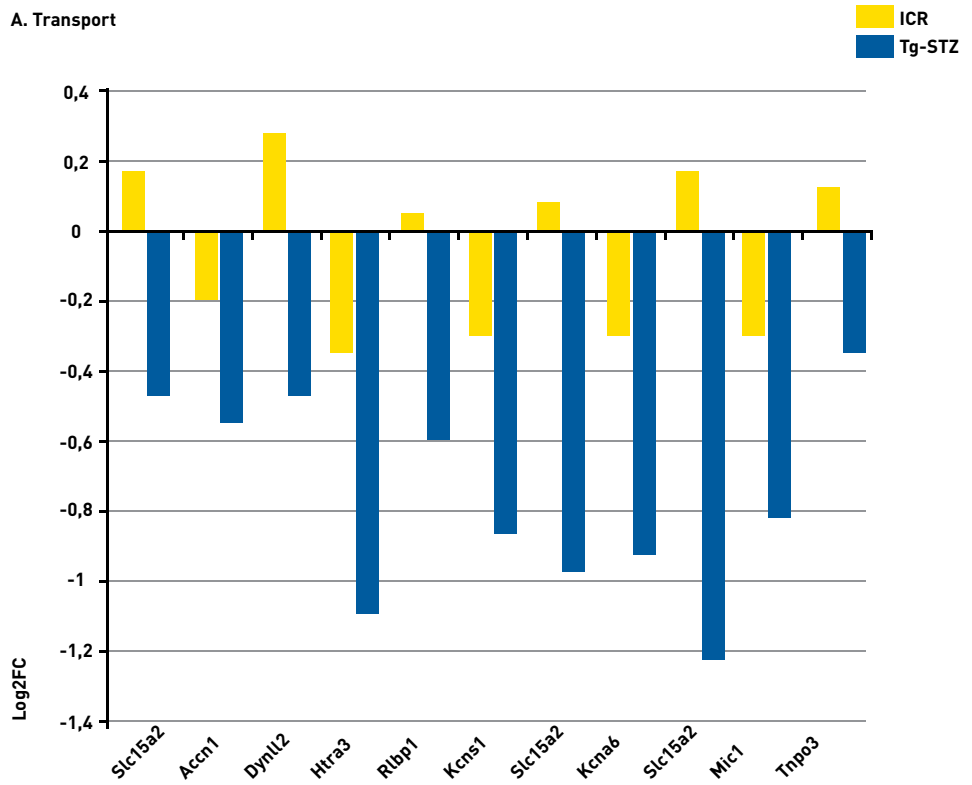
Gens relacionats amb processos de transcripció estaven infrarregulats com (Fig19):

- *D site albumin promoter binding protein* (Dbp), *nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 2* (Nfatc2) o *hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit inhibitor* (Hif1a) en els animals ICR estaven a nivell de *baseline*.
- *Ribonuclease III, nuclear* (Rnasen), *phenylalanine-tRNA synthetase 2* (Fars2), *runt-related transcription factor 1; translocated to, 1 (cyclin D-related)* (Runx1t1) apareixen més infrarregulats que en els ICR.

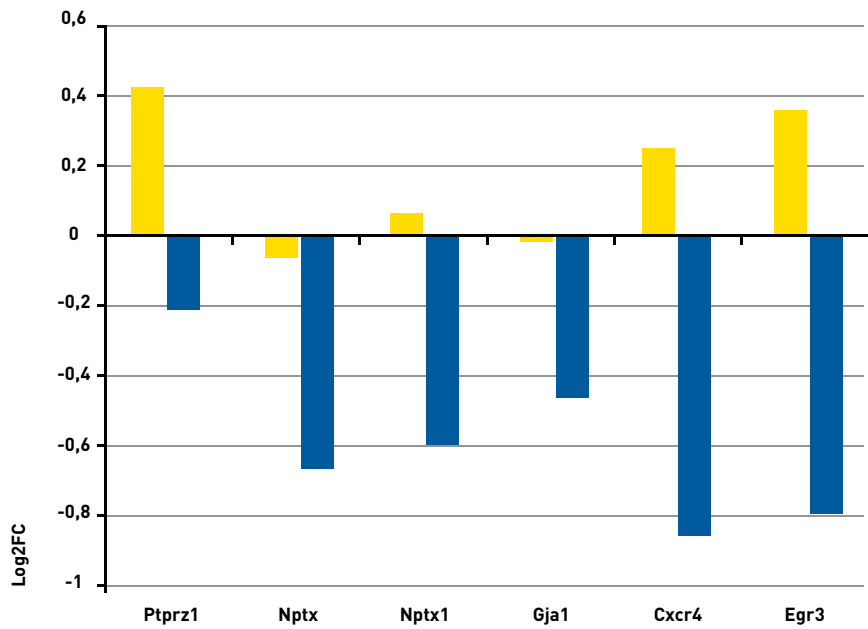
Gens associats a metabolisme apareixien infrarregulats (Fig19):

- *UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 5 (B3galt5), protease, serine, 35 (Prss35)* o *galactosylceramidase (Galc)* relacionats amb metabolisme proteic.
- *F-box and WD-40 domain protein 10; tripartite motif-containing 16 (Trim16)* que és un gen relacionat amb la secreció de la interleucina β .

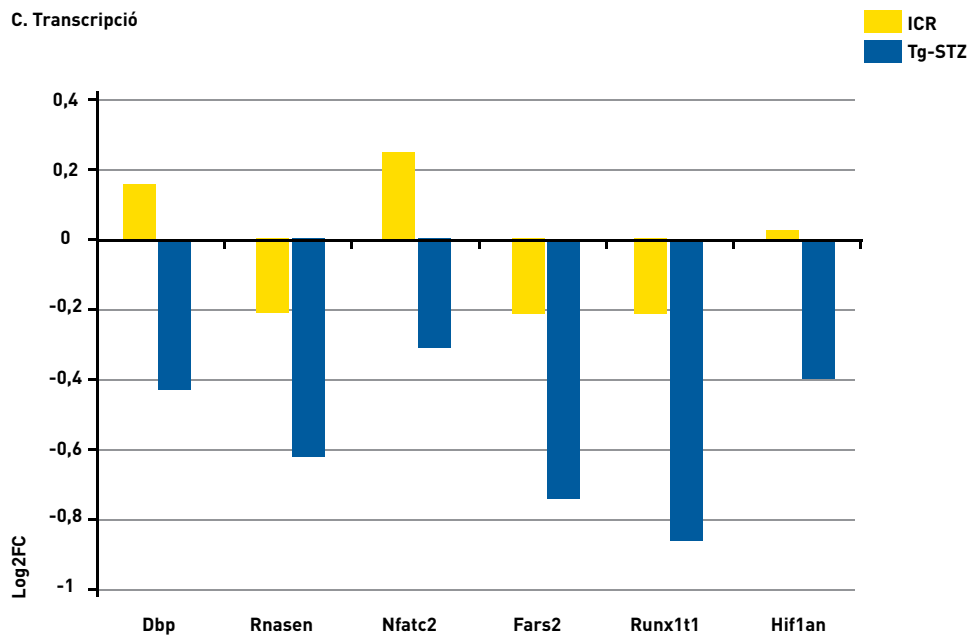
A. Transport



B. Desenvolupament del sistema nerviós



C. Transcripció



D. Metabolisme

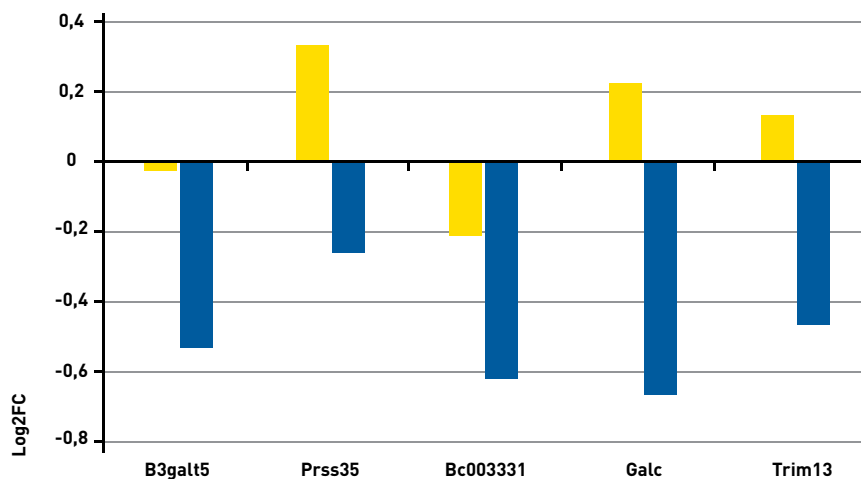


Figura 19. Expressió diferencial de diferents gens infrarregulats dels GAD de les extremitats lesionades d'animals Tg-STZ i ICR., (A) Vies de transport, (B) Vies de desenvolupament del sistema nerviós; (C) Transcripció i (D) Metabolisme. Color blau: expressió gènica en els GAD de les extremitats lesionades dels animals Tg-STZ. Color groc: expressió gènica en els GAD de les extremitats lesionades dels animals ICR.

Taula 5. Gens sobrerregulats, expressats >2 vegades en els GAD de les extremitats lesionades dels animals Tg-STZ comparat amb les extremitats lesionades dels animals ICR amb un P-value < 0.01. Les columnes mostren (d'esquerra a dreta) la identificació d'*Affymetrix* (*Affymetrix ID*), símbol del gen, nom del gen, la mitjana del FC de cada gen, els valors en parèntesis representen la desviació estàndard (DS) i el p-valor utilitzant el mètode de *Benjamini i Hochberg*.

Affymetrix ID	Símbol del gen	Nom del gen	FC de ICR GAD extremitat lesionada (DS)	FC de Tg-STZ GAD extremitat lesionada (DS)	P-valor
1443858_at	9230105E10Rik	predicted gene 4992; predicted gene 8833	1,18 [0,20]	2,07 [0,30]	4,6E-03
1435710_at	Al661384	expressed sequence Al661384	1,84 [0,44]	3,39 [0,83]	1,4E-03
1454770_at	Cckbr	cholecystokinin B receptor	4,16 [0,37]	6,43 [0,93]	1,4E-04
1421679_a_at	Cdkn1a	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A [P21]	1,18 [0,26]	2,22 [0,69]	1,2E-04
1457984_at	Crh	corticotropin releasing hormone	6,55 [0,91]	11,12 [0,72]	1,0E-03
1450020_at	Cx3cr1	similar to chemokine receptor CX3CR1; chemokine [C-X3-C] receptor 1	1,50 [0,23]	2,52 [0,97]	1,4E-03
1456084_x_at	Fmod	fibromodulin	1,38 [0,34]	2,34 [0,10]	9,3E-03
1418876_at	Foxd1	forkhead box D1	1,17 [0,23]	2,03 [0,56]	6,9E-04
1421190_at	Gabrb3	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit beta 3	1,32 [0,67]	2,28 [0,73]	3,9E-03
1460668_at	Gal	galanin	5,14 [0,27]	8,57 [1,10]	8,1E-05
1449526_a_at	Gdpd3	glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 3	1,15 [0,17]	8,02 [0,96]	3,5E-12
1457555_at	Gpr151	G protein-coupled receptor 151	1,83 [0,16]	2,47 [0,04]	3,8E-03
1431008_at	H2-Q6LOC68395	histocompatibility 2, Q region locus 1; histocompatibility 2, Q region locus 9; similar to H-2 class I histocompatibility antigen, L-D alpha chain precursor; histocompatibility 2, Q region locus 8; histocompatibility 2, Q region locus 2; similar to MHC class Ib antigen; histocompatibility 2, Q region locus 7; histocompatibility 2, Q region locus 6; hypothetical protein LOC100044307; similar to H-2 class I histocompatibility antigen, Q7 alpha chain precursor (QA-2 antigen); RIKEN cDNA 0610037M15 gene	1,24 [0,28]	2,12 [0,12]	2,2E-04
1421551_s_at	lfi202b	interferon activated gene 202B	3,74 [0,84]	7,16 [0,71]	4,6E-05
1457666_s_at	lfi202b	interferon activated gene 202B	3,75 [0,29]	6,54 [0,90]	1,1E-04
1437401_at	Igf1	insulin-like growth factor 1	1,38 [0,22]	2,01 [0,26]	3,3E-03
1417185_at	Ly6a	lymphocyte antigen 6 complex, locus A	2,46 [0,50]	3,54 [0,20]	9,0E-03
1457936_at	Mapk8	mitogen-activated protein kinase 8	0,94 [0,03]	2,54 [0,62]	3,6E-07
1437568_at	Mmp16	matrix metalloproteinase 16	2,26 [0,44]	3,02 [0,11]	8,6E-03
1450430_at	Mrc1	mannose receptor, C type 1	1,61 [0,15]	2,29 [0,41]	4,9E-03
1434280_at	NA	widely-interspaced zinc finger motifs	0,96 [0,12]	2,51 [0,92]	1,2E-06
1439224_at	NA	ankyrin repeat and IBR domain containing 1	1,09 [0,50]	2,42 [1,11]	1,2E-03

Affymetrix ID	Símbol del gen	Nom del gen	FC de ICR GAD extremitat lesionada (DS)	FC de Tg-STZ GAD extremitat lesionada (DS)	P-valor
1442893_at	NA	leucine rich repeat transmembrane neuronal 1	0,98 [0,28]	2,94 [0,47]	3,7E-05
1444414_at	NA	apolipoprotein D	1,40 [0,38]	2,49 [0,30]	1,0E-04
1444749_at	NA	apolipoprotein D	1,33 [0,20]	2,10 [0,25]	1,3E-04
1458719_at	NA	glucagon-like peptide 1 receptor; similar to glucagon-like peptide-1 receptor	1,00 [0,12]	2,03 [0,41]	2,1E-05
1425132_at	Neto1	neuropilin (NRP) and tolloid (TLL)-like 1	1,22 [0,10]	2,07 [0,56]	3,0E-04
1456283_at	Neto1	neuropilin (NRP) and tolloid (TLL)-like 1	1,83 [0,16]	2,47 [0,04]	2,5E-03
1421471_at	Npy1r	neuropeptide Y receptor Y1	1,54 [0,46]	2,58 [1,00]	8,9E-03
1419662_at	Ogn	osteoglycin	1,36 [0,27]	2,09 [0,44]	5,0E-03
1416321_s_at	Prelp	proline arginine-rich end leucine-rich repeat	1,34 [0,24]	2,21 [0,47]	1,0E-03
1420398_at	Rgs18	regulator of G-protein signaling 18	1,76 [0,69]	3,51 [0,50]	1,9E-04
1449856_at	Rgs18	regulator of G-protein signaling 18	1,57 [0,37]	2,87 [0,98]	7,6E-04
1456120_at	Secisbp2l	SECIS binding protein 2-like	1,07 [0,13]	2,23 [1,06]	2,9E-03
1418282_x_at	Serpina1b	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 1B	1,16 [0,09]	2,33 [0,38]	1,2E-03
1451513_x_at	serpina1b	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 1A	1,28 [0,10]	2,32 [0,50]	1,9E-03
1427221_at	Slc6a20a	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 20A	1,28 [0,66]	2,64 [1,10]	5,7E-03
1417150_at	Slc6a4	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4	1,93 [0,18]	2,67 [0,57]	9,6E-03
1429051_s_at	Sox11	SRY-box containing gene 11	2,20 [0,33]	3,12 [0,20]	8,8E-03
1449133_at	Sprr1a	small proline-rich protein 1A	9,38 [0,38]	15,89 [5,12]	4,3E-03
1460378_a_at	Tes	testis derived transcript	1,46 [0,14]	2,04 [0,36]	3,7E-03
1415871_at	Tgfb1	transforming growth factor, beta induced	1,44 [0,35]	2,13 [0,55]	7,3E-03
1448123_s_at	Tgfb1	transforming growth factor, beta induced	1,46 [0,26]	2,19 [0,53]	6,2E-03

Taula 6. Gens infrarregulats, expressats <1 vegades en els GAD de les extremitats lesionades dels animals Tg-STZ comparat amb les extremitats lesionades dels animals ICR amb un P-value < 0.01 . Les columnes mostren (d'esquerra a dreta) la identificació d'*Affymetrix* (*Affymetrix ID*), símbol del gen, nom del gen, la mitjana del FC de cada gen, els valors en parèntesis representen la desviació estàndard (DS) i el p-valor utilitzant el mètode de *Benjamini i Hochberg*.

Affymetrix ID	Símbol del gen	Nom del gen	FC de ICR GAD extremitat lesionada (DS)	FC de Tg-STZ GAD extremitat lesionada (DS)	P-valor
1430660_at	1500004A13Rik	RIKEN cDNA 1500004A13 gene	1,07 (0,16)	0,63 (0,12)	3,4E-03
1439669_at	6430571L13Rik	RIKEN cDNA 6430571L13 gene	0,86 (0,04)	0,62 (0,15)	5,4E-03
1449936_at	8430419L09Rik	RIKEN cDNA 8430419L09 gene	1,06 (0,23)	0,77 (0,11)	8,7E-03
1454056_at	9030407P20Rik	RIKEN cDNA 9030407P20 gene	0,95 (0,16)	0,67 (0,02)	2,0E-03
1457523_at	9530056K15Rik	RIKEN cDNA 9530056K15 gene	0,92 (0,09)	0,62 (0,04)	2,1E-03
1459083_at	A330084C13Rik	RIKEN cDNA A330084C13 gene	0,86 (0,12)	0,53 (0,10)	2,7E-04
1417994_a_at	Accn1	amiloride-sensitive cation channel 1, neuronal (degenerin)	0,88 (0,16)	0,68 (0,05)	8,4E-03
1444974_at	AU023617	expressed sequence AU023617	0,97 (0,09)	0,67 (0,12)	4,3E-03
1428397_at	B3galt5	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 5	0,98 (0,10)	0,68 (0,16)	3,6E-03
1424951_at	Baiap2l1	BAI1-associated protein 2-like 1	1,02 (0,10)	0,73 (0,10)	4,2E-03
1434471_at	BC003331	similar to odorant response abnormal 4; cDNA sequence BC003331	0,87 (0,12)	0,66 (0,05)	5,3E-03
1439707_at	C230034021Rik	RIKEN cDNA C230034021 gene	0,99 (0,06)	0,70 (0,03)	4,2E-03
1456934_at	Calb1	calbindin 1	0,85 (0,05)	0,55 (0,17)	2,0E-03
1431255_at	Calr3	calreticulin 3	0,93 (0,07)	0,65 (0,19)	7,5E-03
1429443_at	Cpne4	copine IV	0,99 (0,05)	0,74 (0,15)	9,7E-03
1422141_s_at	Csprs	similar to putative G-protein coupled receptor; predicted gene 2635; component of Sp100-rs; predicted gene 2666; predicted gene 7582; predicted gene 7592; predicted gene 7609	0,97 (0,26)	0,40 (0,02)	2,7E-04
1435792_at	Csprs Gm 7582	similar to putative G-protein coupled receptor; predicted gene 2635; component of Sp100-rs; predicted gene 2666; predicted gene 7582; predicted gene 7592; predicted gene 7609	1,04 (0,33)	0,31 (0,13)	9,0E-04
1448710_at	Cxcr4	chemokine [C-X-C motif] receptor 4	1,18 (0,20)	0,57 (0,11)	2,3E-04
1438211_s_at	Dbp	D site albumin promoter binding protein	1,11 (0,07)	0,75 (0,12)	3,4E-03
1458541_at	Dctn4	dynactin 4	0,96 (0,07)	0,60 (0,10)	3,7E-03
1418258_s_at	Dynll2	dynein light chain LC8-type 2	1,20 (0,35)	0,70 (0,05)	1,2E-03
1422412_x_at	Ear3	eosinophil-associated, ribonuclease A family, member 3; eosinophil-associated, ribonuclease A family, member 12; eosinophil-associated, ribonuclease A family, member 2	1,61 (0,95)	0,77 (0,30)	4,1E-03

Affymetrix ID	Símbol del gen	Nom del gen	FC de ICR GAD extremitat lesionada (DS)	FC de Tg-STZ GAD extremitat lesionada (DS)	P-valor
1437478_s_at	Efhd2	similar to EF hand domain containing 2; EF hand domain containing 2	1,14 [0,17]	0,47 [0,16]	1,6E-04
1436329_at	Egr3	early growth response 3	1,28 [0,28]	0,58 [0,09]	1,6E-04
1442379_at	Fam196b	predicted gene 6041	0,92 [0,01]	0,58 [0,07]	2,1E-04
1439406_x_at	Fars2	phenylalanine-tRNA synthetase 2 [mitochondrial]	0,87 [0,16]	0,62 [0,08]	7,6E-03
1452267_at	Flywch1	FLYWCH-type zinc finger 1	0,73 [0,07]	0,99 [0,09]	3,8E-03
1452907_at	Galc	galactosylceramidase	1,17 [0,10]	0,63 [0,15]	1,0E-04
1438973_x_at	Gja1	gap junction protein, alpha 1	0,99 [0,14]	0,73 [0,01]	8,6E-03
1443997_at	Gprin2	G protein regulated inducer of neurite outgrowth 2	0,98 [0,08]	0,74 [0,05]	5,0E-03
1418917_at	Hebp2	heme binding protein 2	0,88 [0,13]	0,61 [0,11]	6,7E-04
1452845_at	Hif1an	hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit inhibitor	1,02 [0,01]	0,76 [0,09]	7,2E-03
1445565_at	Hist1h1e	histone cluster 1, H1e	1,15 [0,12]	0,83 [0,01]	1,8E-03
1422155_at	Hist2h3c2	histone cluster 2, H3b; histone cluster 1, H3f; histone cluster 1, H3e; histone cluster 2, H3c1; histone cluster 1, H3d; histone cluster 1, H3c; histone cluster 1, H3b; histone cluster 2, H3c2; histone cluster 2, H2aa1; histone cluster 2, H2aa2	1,10 [0,01]	0,82 [0,37]	8,1E-03
1455712_at	Hist3h2a	histone cluster 3, H2a	0,97 [0,16]	0,72 [0,12]	3,2E-03
1418268_at	Htr3a	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3A	0,70 [0,09]	0,46 [0,06]	6,1E-04
1443793_x_at	Ints1	integrator complex subunit 1	0,95 [0,12]	0,59 [0,08]	3,8E-04
1440557_at	lpw	imprinted gene in the Prader-Willi syndrome region	1,11 [0,04]	0,57 [0,07]	2,2E-06
1441049_at	Kcna6	potassium voltage-gated channel, shaker-related, subfamily, member 6	0,80 [0,04]	0,53 [0,04]	2,2E-03
1421518_at	Kcns1	K+ voltage-gated channel, subfamily S, 1	0,81 [0,06]	0,55 [0,09]	2,4E-03
1440147_at	Lgi2	leucine-rich repeat LGI family, member 2	0,90 [0,13]	0,65 [0,09]	3,5E-03
1455883_a_at	Lrrtm1	leucine rich repeat transmembrane neuronal 1	1,17 [0,09]	0,74 [0,17]	6,2E-04
1422903_at	Ly86	lymphocyte antigen 86	0,79 [0,14]	0,43 [0,21]	2,4E-03
1418936_at	Maff	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein F (avian)	0,93 [0,89]	0,68 [0,10]	4,3E-03
1425510_at	Mark1	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 1	1,02 [0,14]	0,67 [0,02]	7,2E-03

Affymetrix ID	Símbol del gen	Nom del gen	FC de ICR GAD extremitat lesionada (DS)	FC de Tg-STZ GAD extremitat lesionada (DS)	P-valor
1449630_s_at	Mark1	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 1	1,02 (0,09)	0,70 (0,03)	7,6E-03
1451858_at	Mgrpra2a, mgrpra2b	MAS-related GPR, member A2; similar to Mrgpra2 protein	0,85 (0,05)	0,41 (0,10)	1,5E-05
1448139_at	Mlc1	megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts 1 homolog (human)	0,82 (0,07)	0,56 (0,07)	1,2E-03
1419362_at	Mrpl35	mitochondrial ribosomal protein L35	1,14 (0,10)	0,80 (0,25)	2,0E-03
1440989_at	Mrpl35	mitochondrial ribosomal protein L35	0,88 (0,03)	0,61 (0,12)	1,8E-03
1421836_at	Mtap7	microtubule-associated protein 7	1,07 (0,13)	0,79 (0,22)	2,9E-03
1419118_at	NA	hypothetical protein LOC100045106; V-set and transmembrane domain containing 2B	0,74 (0,04)	0,54 (0,04)	3,4E-03
1428037_at	NA	similar to otoancorin	0,87 (0,04)	0,60 (0,05)	2,3E-03
1436092_at	NA	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein A (avian)	0,84 (0,09)	0,60 (0,07)	1,3E-03
1436246_at	NA		1,19 (0,07)	0,73 (0,02)	7,1E-05
1444020_at	NA	neurocan; similar to Neurocan	1,15 (0,12)	0,72 (0,01)	4,8E-03
1452452_at	NA	Envelope glycoprotein	1,04 (0,25)	0,66 (0,05)	3,8E-03
1455298_at	NA	inhibitor of DNA binding 4	0,94 (0,10)	0,68 (0,07)	4,9E-03
1455715_at	NA	hypothetical LOC100038746	0,77 (0,04)	0,36 (0,10)	1,7E-05
1455869_at	NA	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, beta	0,96 (0,54)	0,32 (0,06)	1,2E-03
1456781_at	NA	SRY-box containing gene 2	1,33 (0,13)	0,96 (0,10)	9,2E-03
1456900_at	NA		0,90 (0,08)	0,66 (0,07)	8,1E-03
1457822_at	NA	similar to transmembrane protein 131; transmembrane protein 131	1,02 (0,07)	0,74 (0,12)	4,8E-03
1458707_at	NA	RIKEN cDNA E430016F16 gene	0,94 (0,09)	0,67 (0,13)	1,1E-03
1459226_at	NA		0,97 (0,19)	0,66 (0,13)	7,2E-03
1439205_at	Nfatc2	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 2	1,20 (0,28)	0,80 (0,03)	2,9E-03
1422130_at	Nptx1	neuronal pentraxin 1	1,05 (0,21)	0,66 (0,14)	6,1E-04
1434877_at	Nptx1	neuronal pentraxin 1	0,95 (0,07)	0,64 (0,14)	1,1E-03
1456974_at	Onecut1	one cut domain, family member 1	0,93 (0,09)	0,65 (0,13)	1,6E-03
1430667_at	Pcdh10	protocadherin 10	1,11 (0,06)	0,76 (0,11)	2,2E-03
1449351_s_at	Pdgfc	platelet-derived growth factor, C polypeptide	1,30 (0,18)	0,94 (0,15)	6,2E-03
1419309_at	Pdpm	podoplanin	1,02 (0,05)	0,75 (0,05)	6,4E-03

Affymetrix ID	Símbol del gen	Nom del gen	FC de ICR GAD extremitat lesionada (DS)	FC de Tg-STZ GAD extremitat lesionada (DS)	P-valor
1453147_at	Polr3e	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide E	0,96 [0,08]	0,68 [0,10]	4,8E-03
1434195_at	Prss35	protease, serine, 35	1,23 [0,10]	0,84 [0,06]	1,9E-03
1434891_at	Ptgfrn	prostaglandin F2 receptor negative regulator	1,19 [0,07]	0,88 [0,11]	4,8E-03
1418690_at	Ptprz1	protein tyrosine phosphatase, receptor type Z, polypeptide 1	1,35 [0,24]	0,86 [0,03]	2,6E-03
1418310_a_at	Rlbp1	retinaldehyde binding protein 1	1,03 [0,09]	0,66 [0,11]	6,0E-04
1438505_s_at	Rnasen	ribonuclease III, nuclear	0,87 [0,11]	0,64 [0,11]	2,6E-03
1440310_at	Runx1t1	runt-related transcription factor 1; translocated to, 1 (cyclin D-related)	0,86 [0,02]	0,55 [0,17]	2,3E-03
1452849_at	Sin3b	transcriptional regulator, SIN3B (yeast)	1,10 [0,15]	0,81 [0,02]	7,1E-03
1417600_at	Slc15a2	solute carrier family 15 (H+/peptide transporter), member 2	1,11 [0,28]	0,70 [0,28]	2,7E-03
1424730_a_at	Slc15a2	solute carrier family 15 (H+/peptide transporter), member 2	1,07 [0,27]	0,51 [0,07]	1,2E-04
1447808_s_at	Slc15a2	solute carrier family 15 (H+/peptide transporter), member 2	1,11 [0,29]	0,43 [0,06]	3,9E-06
1416950_at	Tnfaip8	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8	1,13 [0,24]	0,75 [0,18]	2,3E-03
1449678_at	Tnpo3	transportin 3	1,09 [0,11]	0,78 [0,10]	3,8E-03
1460629_at	Trim16	F-box and WD-40 domain protein 10; tripartite motif-containing 16	1,12 [0,18]	0,73 [0,11]	3,4E-03
1424857_a_at	Trim34	similar to tripartite motif protein TRIM34 alpha; tripartite motif-containing 34; similar to Tripartite motif protein 34	1,10 [0,23]	0,72 [0,28]	6,3E-03
1434249_s_at	Trim9	tripartite motif-containing 9	1,03 [0,06]	0,69 [0,26]	5,1E-03
1420017_at	Tspan8	tetraspanin 8	0,92 [0,14]	0,60 [0,03]	7,4E-04
1420018_s_at	Tspan8	tetraspanin 8	0,88 [0,11]	0,47 [0,08]	2,5E-04
1422695_at	Ttyh1	tweety homolog 1 (Drosophila)	1,06 [0,07]	0,73 [0,05]	2,7E-03
1415861_at	Tyrp1	tyrosinase-related protein 1	1,05 [0,31]	0,40 [0,02]	1,1E-07
1415862_at	Tyrp1	tyrosinase-related protein 1	1,07 [0,32]	0,47 [0,01]	2,4E-05
1439409_x_at	Tyrp1	tyrosinase-related protein 1	0,94 [0,11]	0,43 [0,06]	7,9E-07
1426417_at	Yipf4	Yip1 domain family, member 4	0,88 [0,05]	0,60 [0,06]	7,8E-04
1450418_a_at	Yipf4	Yip1 domain family, member 4	0,95 [0,15]	0,62 [0,06]	8,9E-03

6. IV. ANÀLISI CONJUNT: TG-STZ NO LESIONADES I LESIONADES VS ICR NO LESIONADES I LESIONADES

L'anàlisi conjunt de l'expressió gènica dels GAD de les extremitats no lesionades i dels GAD de les extremitats lesionades dels animals Tg-STZ vs els animals ICR es va dur a terme per determinar quins gens són específics del procés diabètic i quins de degeneració i regeneració nerviosa 4 setmanes després d'una lesió per aixafament del nervi ciàtic, un cop instaurat un procés diabètic de 8 setmanes de duració.

De l'anàlisi conjunta dels perfils de l'expressió gènica de les comparatives dels Tg-STZ no lesionades vs ICR no lesionades amb Tg-STZ lesionades vs ICR lesionades, hi havia 135 gens en comú:

199 gens que només es troben en els GAD de les extremitats no lesionades dels animals Tg-STZ vs les extremitats no lesionades dels animals ICR; i 205 gens que només es troben en els GAD de les extremitats lesionades dels animals Tg-STZ vs les extremitats lesionades dels animals ICR.

La representació gràfica s'ha fet en un diagrama de Venn (Fig20).

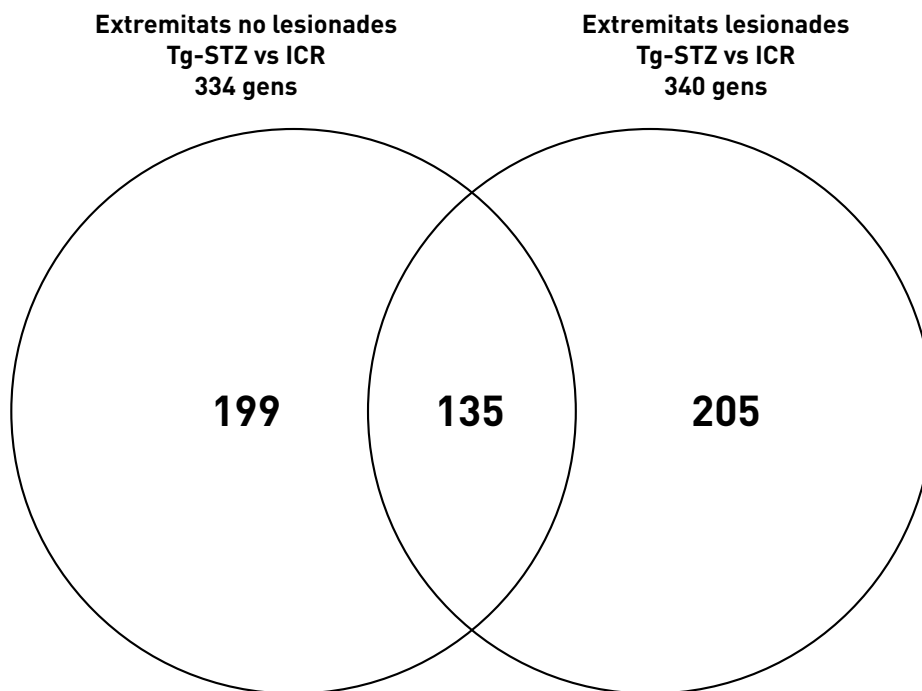


Figura 20. Diagrama de Venn. Gens comuns i no comuns, entre l'estudi de l'expressió gènica dels GAD de les extremitats no lesionades dels animals Tg-STZ vs les extremitats no lesionades dels animals ICR (anàlisi comparatiu II) i l'estudi de l'expressió gènica dels GAD de les extremitats lesionades dels animals Tg-STZ vs les extremitats lesionades dels animals ICR (anàlisi comparatiu III).

**6.1. GENS COINCIDENTS:
TG-STZ NO LESIONADES VS ICR NO LESIONADES I
TG-STZ LESIONADES VS ICR LESIONADES**

Dels 135 gens, 51 estaven infrarregulats, 56 es trobaven a nivell de *baseline* i 28 estaven sobrerregulats amb un FC superior a 2.

Els processos biològics més destacats ens els que es troben involucrats els 135 gens van ser (Fig21):

- Transport [13 gens, (9,63%)]
- Senyalització [12 gens, (8,89%)]
- Resposta immunitària [12 gens, (8,89%)]
- Metabolisme [10 gens, (7,41%)]
- Transcripció [10 gens, (7,41%)]
- Desenvolupament del sistema nerviós [10 gens, (7,41%)]
- Resposta a substàncies orgàniques [5 gens, (3,70%)]
- Apoptosi [4 gens, (2,96%)]
- Adhesió cel·lular [4 gens, (2,96%)]
- Pigmentació [3 gens, (2,22%)]

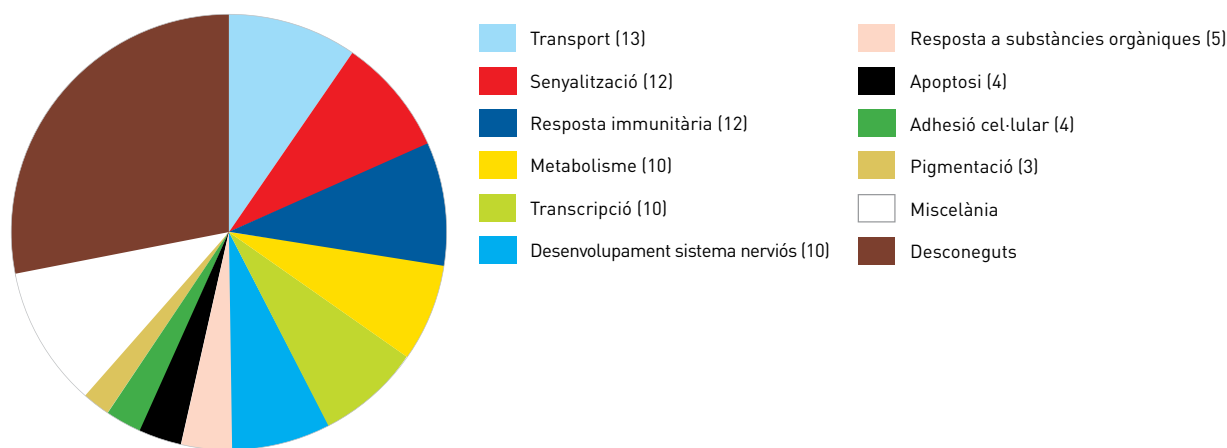


Figura 21. Processos biològics de *Gene Ontology* (GO) dels gens amb expressió diferencial significativa que coincideixen entre l'estudi de l'expressió gènica dels GAD de les extremitats no lesionades dels animals Tg-STZ vs les extremitats no lesionades dels animals ICR (anàlisi comparatiu II 2) i l'estudi de l'expressió gènica dels GAD de les extremitats lesionades dels animals Tg-STZ vs les extremitats lesionades dels animals ICR (anàlisi comparatiu III 3). (n= nombre de gens per categoria).

Els 28 gens sobrerregulats més de 2 vegades estaven relacionats amb:

- Senyalització cel·lular com Rgs18 o Igf1, i associats a proteïnes G.
- Desenvolupament del sistema nerviós com: Foxd1, Sprr1a, Mapk i Gal.
- Resposta a substàncies orgàniques com: hormones *deserine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 1A* (Serpina1b) i com a resposta a l'*INFbeta, interferon activated gene 202B* (Ifi202b).
- Resposta immunitària, com *similar to chemokine receptor CX3CR1; chemokine (C-X3-C) receptor 1* (Cx3cr1) que és activador de la micròglia davant d'una lesió.

Els 51 gens infrarregulats, estaven relacionats amb:

- Transport de substàncies, com canals de potassi: Kcns1, Kcna6, Kcnj13 o el transport de soluts: Slc15a2 i Slc6a6, entre d'altres.
- Transcripció: *Mitochondrial ribosomal protein L35* (Mrpl35), Hist2h3c2, Dbp, Rnasen, Fars2 i Runx1t1.
- Senyalització cel·lular associats a proteïnes G.
- Metabolisme d'hidrats de carboni, Galc, i de proteòlisi, Prss35.

6.2. GENS QUE S'EXPRESSEN ÚNICAMENT EN TG-STZ NO LESIONADES VS ICR NO LESIONADES

Hi havia 199 gens amb expressió diferencial significativa en els GAD de les extremitats no lesionades dels animals Tg-STZ vs les extremitats no lesionades dels ICR. Dels 199 gens, 53 gens estaven infrarregulats i 146 sobrerregulats a nivell de *baseline*, d'aquests només 15 estaven sobrerregulats més de 2 vegades.

Els processos biològics més destacats ens els que es troben involucrats els 199 gens van ser (Fig22):

- Metabolisme [26 gens, (13,07%)]
- Transcripció [25 gens, (12,56%)]
- Senyalització [15, (7,54%)]
- Desenvolupament del sistema nerviós [15 gens, (7,54%)]
- Transport [14 gens, (7,04%)]
- Resposta immunitària [12 gens, (6,03%)]
- Adhesió cel·lular [11 gens, (5,53%)]
- Matriu extracel·lular [7 gens, (3,52%)]
- Apoptosi [5 gens, (2,51%)]
- Proliferació cel·lular [4 gens, (2,01%)]
- Diferenciació cel·lular [3 gens, (1,51%)]
- Desenvolupament cel·lular [3 gens, (1,51%)]

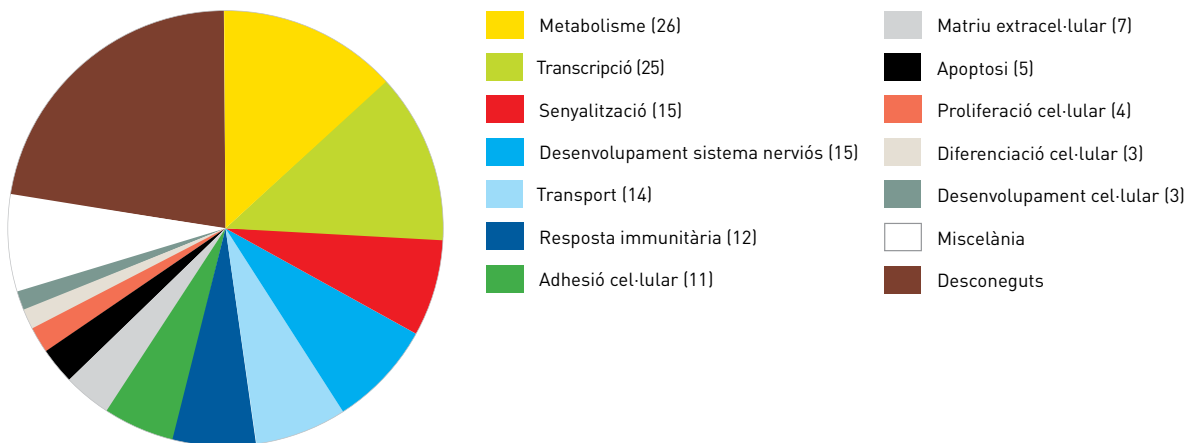


Figura 22. Processos biològics de *Gene Ontology* (GO) dels gens amb expressió diferencial significativa que només apareixen en l'estudi de l'expressió gènica dels GAD de les extremitats no lesionades dels animals Tg-STZ vs les extremitats no lesionades dels animals ICR (anàlisi comparatiu II 2). (n= nombre de gens per categoria).

Els 15 gens sobrerregulats més de 2 vegades estan implicats en:

- Metabolisme proteic com *cathepsin S* (Ctss) o *CD36 antigen* (Cd36) i d'hidrats de carboni com *carbonic anhydrase 3* (Car3).
- Transport de substàncies i iònques com *transferrin* (Trf), *cytochrome b-245, beta polypeptide* (Cybb) i *RAN binding protein 3-like* (Ranbp3l) que participa en el transport intracel·lular.
- Transcripció com *fatty acid binding protein 4, adipocyte* (Fabp4) o *ELK3, member of ETS oncogene family* (Elk3).
- Resposta immunitària com *catenin (cadherin associated protein), alpha 2* (Cdf)

Dels 53 gens infrarregulats:

- Transport de substàncies, com transport de proteïnes, *vacuolar protein sorting 13B (yeast)* (Vps13b), *RAB37, member of RAS oncogene family* (Rab37), *sorting nexin 11* (Snx11), *selenium binding protein 1; hypothetical protein LOC100044204* (Selenbp1); transport de calci, *ORAI calcium release-activated calcium modulator 1* (Orai1), *transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1* (Trpv1) i transport de potassi *Kctd12*, *Kcnq5* i *Kcnt1*.
- Desenvolupament de sistema nerviós, com *Hes5* que és inhibidor de la diferenciació cel·lular i *Meteorin, glial cell differentiation regulator* (Metrn), *Lingo1, neuron-glia-CAM-related cell adhesion molecule* (Nrcam) i *chemokine (C-X-C motif) ligand 12* (Cxcl12) que intervenen en la migració i la guia de l'axó.
- Apoptosi com *E2F transcription factor 1* (E2f1) i gens antiapoptòtics com *Ctsb, angiopoietin 1* (Angpt1) i *eukaryotic translation elongation factor 1 epsilon 1* (Eef1e1).

6.3. GENS QUE S'EXPRESSEN ÚNICAMENT EN TG-STZ LESIONADES VS ICR LESIONADES

Hi havia 205 gens amb expressió diferencial significativa en els GAD de les extremitats lesionades dels animals Tg-STZ vs les extremitats lesionades dels animals ICR. Dels 205 gens, 46 es trobaven infrarregulats i 159 sobrerregulats a nivell de *baseline*; d'aquests, 18 es trobaven sobrerregulats més de 2 vegades.

Els processos biològics més destacats ens els que es troben involucrats els 205 gens van ser (Fig23):

- Metabolisme [22 gens, (10,73%)]
- Transport [14 gens, (6,83%)]
- Transcripció [13 gens, (6,34%)]
- Matriu extracel·lular [12 gens, (5,85%)]
- Desenvolupament del sistema nerviós [11 gens, (5,37%)]
- Senyalització [9 gens, (4,39%)]
- Resposta immunitària [7 gens, (3,41%)]
- Proliferació cel·lular [6 gens (2,93%)]
- Desenvolupament cel·lular [6 gens (2,93%)]
- Transmissió sinàptica [6 gens (2,93%)]
- Migració cel·lular [4 gens (1,95%)]
- Divisió cel·lular/cicle cel·lular [4 gens (1,95%)]
- Apoptosi [4 gens (1,95%)]
- Assemblatge del nucleosoma [3 gens (1,46%)]
- Resposta a substàncies orgàniques [3 gens (1,46%)]

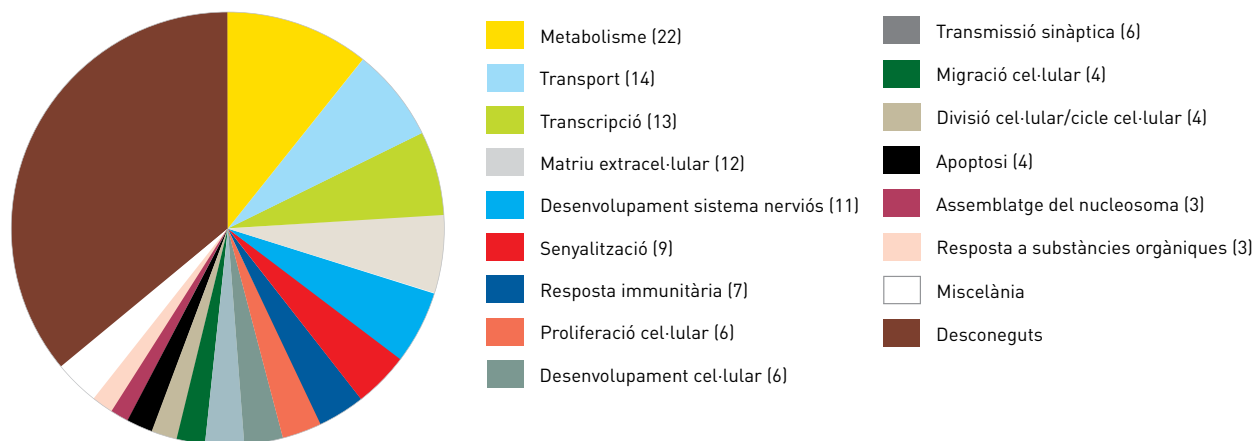


Figura 23. Processos biològics de *Gene Ontology* (GO) dels gens amb expressió diferencial significativa que només apareixen en l'estudi de l'expressió gènica dels GAD de les extremitats lesionades dels animals Tg-STZ vs les extremitats lesionades dels animals ICR (anàlisi comparatiu III3). (n= nombre de gens per categoria).

Els processos biològics en els que intervenen els 18 gens sobrerregulats més de 2 vegades van ser:

- Organització de la matriu extracel·lular: Tgfi, el qual també té un rol en l'adhesió cel·lular i Mmp16 associat també al catabolisme proteic del col·lagen.
- Transmissió sinàptica: Neto1 i Cckbr.
- Senyalització entre cèl·lules: Gpr151 i Npy1r, que també pot estar relacionat amb vies de senyalització de neuropèptids i de dolor.
- Transport: Slc6a4 que codifica per proteïnes que són canals de transport de soluts.
- Desenvolupament del sistema nerviós: Sox11.

Els 46 gens infraregulats estaven associats a processos biològics com:

- Vies inhibides de transport: Mrlp35, Slc39a6, Tnpo3 i, Accn1 i Dynll2, aquests dos últims relacionats amb el transport sinàptic.
- Inhibició de vies del desenvolupament del sistema nerviós: Ptporz1, Nptx, Gja1 i Cxcr4.
- Matriu extracel·lular: *BAI1-associated protein 2-like 1* (Baiap2l1) i *MAP/microtubule affinity-regulating kinase 1* (Mark1).
- Processos metabòlics: Trim16 i B3galt5.

7. PROCESSOS BIOLÒGICS

7.1. SENYALITZACIÓ

7.2. DESENVOLUPAMENT DEL SISTEMA NERVIÓS

7.3. DOLOR NEURPÀTIC

7.4. TRANSMISSIÓ SINÀPTICA

7.5. MÀTRIU EXTRACEL·LULAR

7.6. TRANSPORT

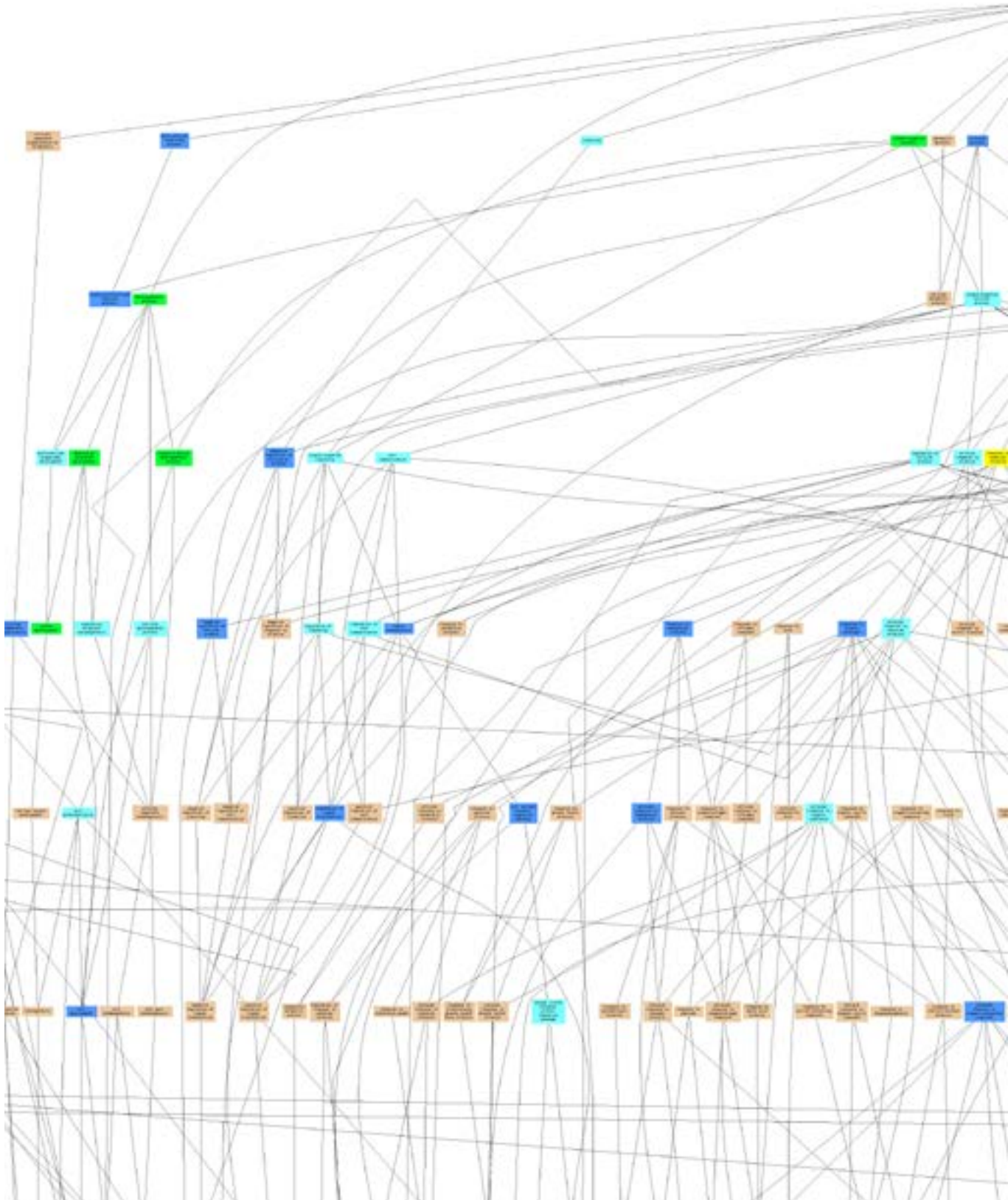
7.7. APOPTOSI

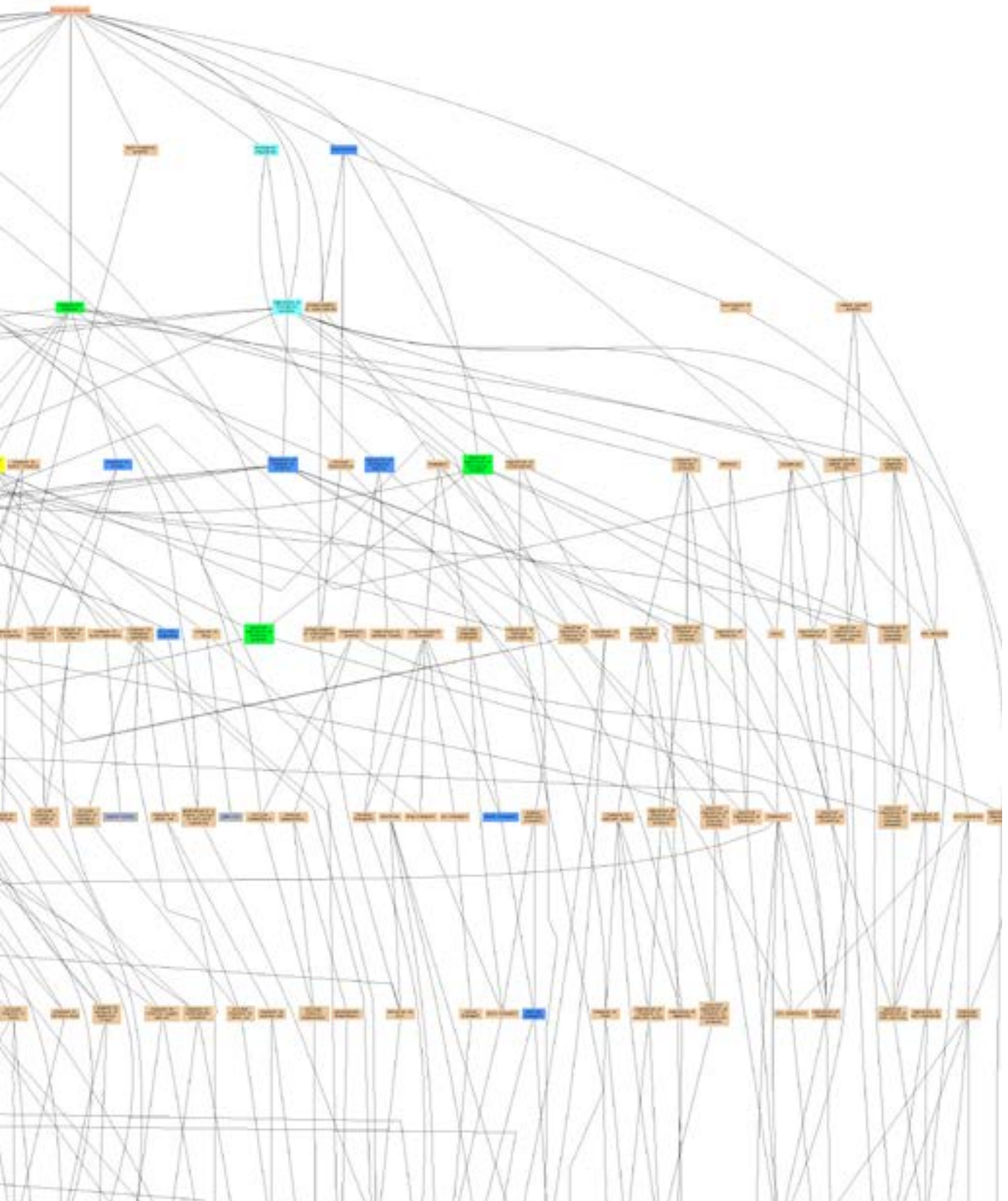
7.8. RESPOSTA IMMUNE

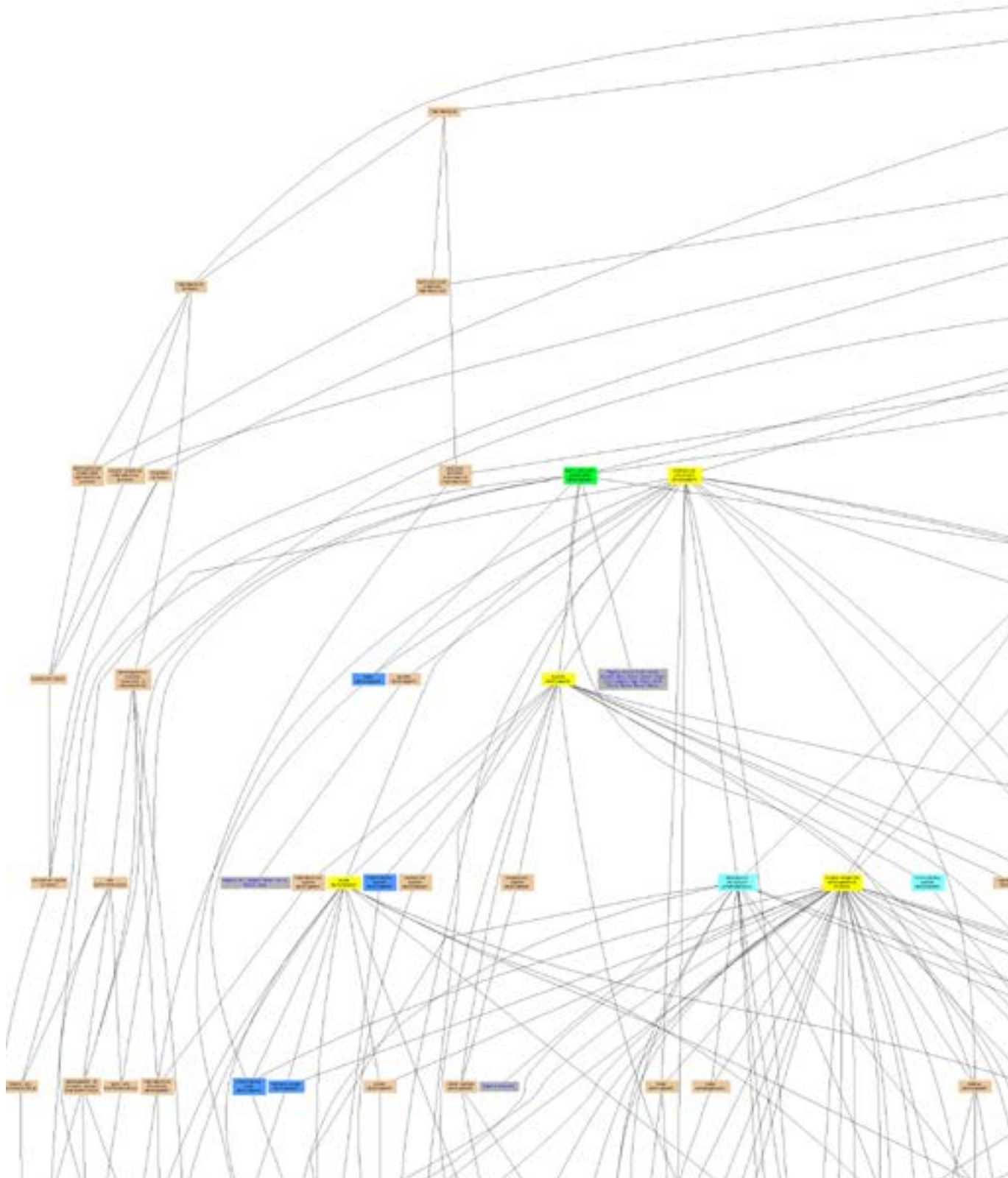
7.9. METABOLISME

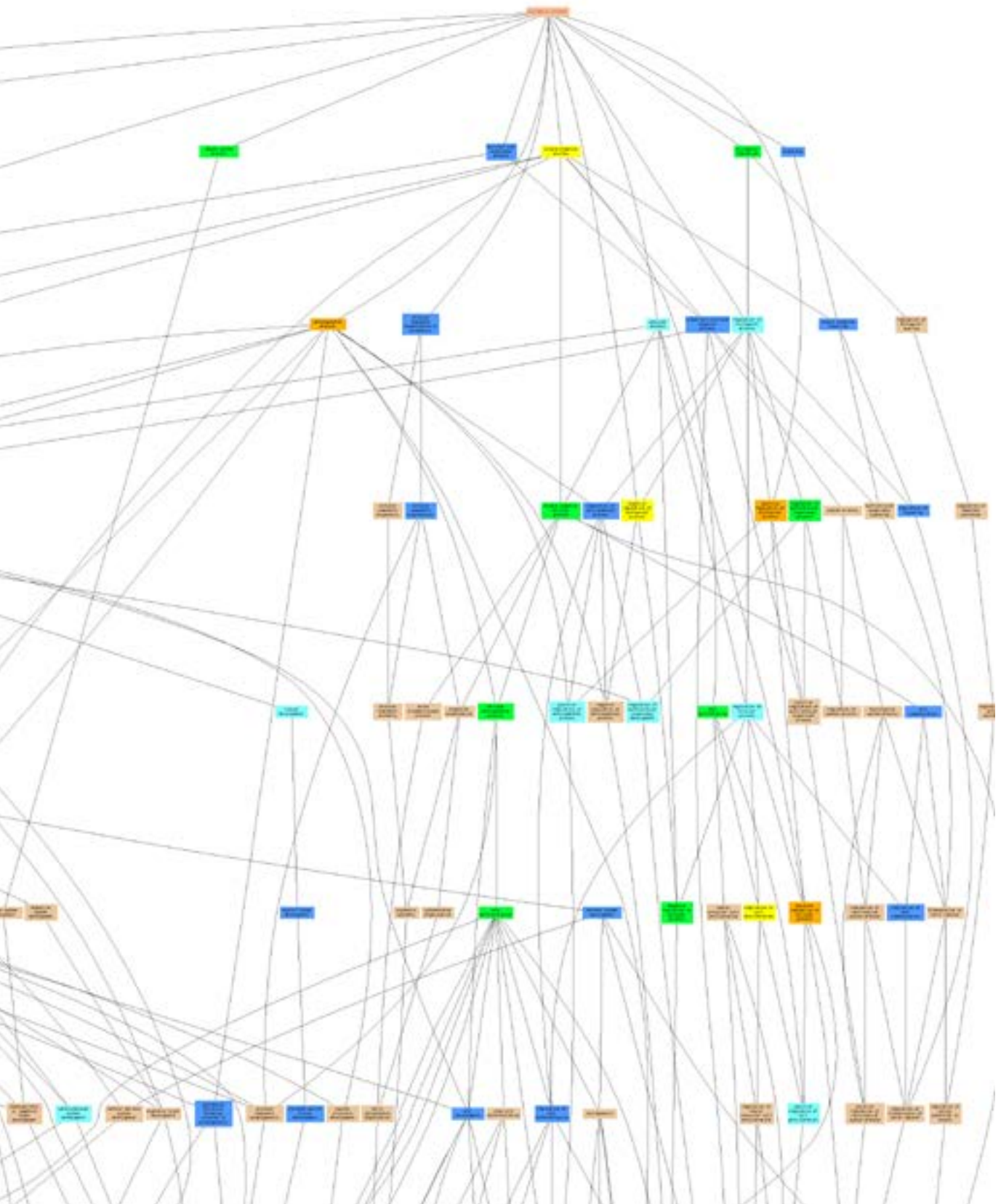
(veure fig.24)

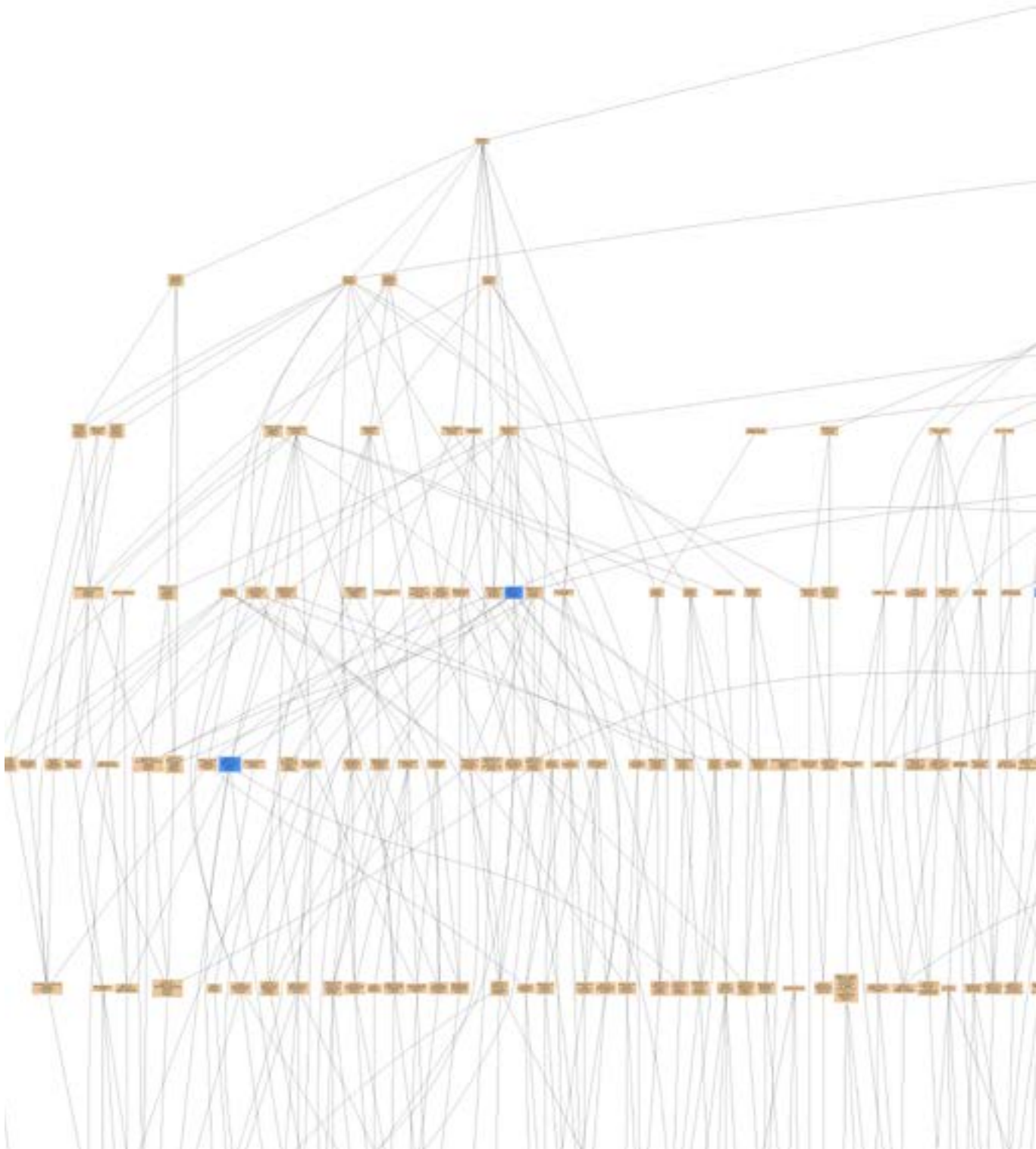
Figura 24. Processos biològics de *Gene Ontology* (GO) dels gens amb expressió diferencial significativa, segons la base de dades de Princeton.

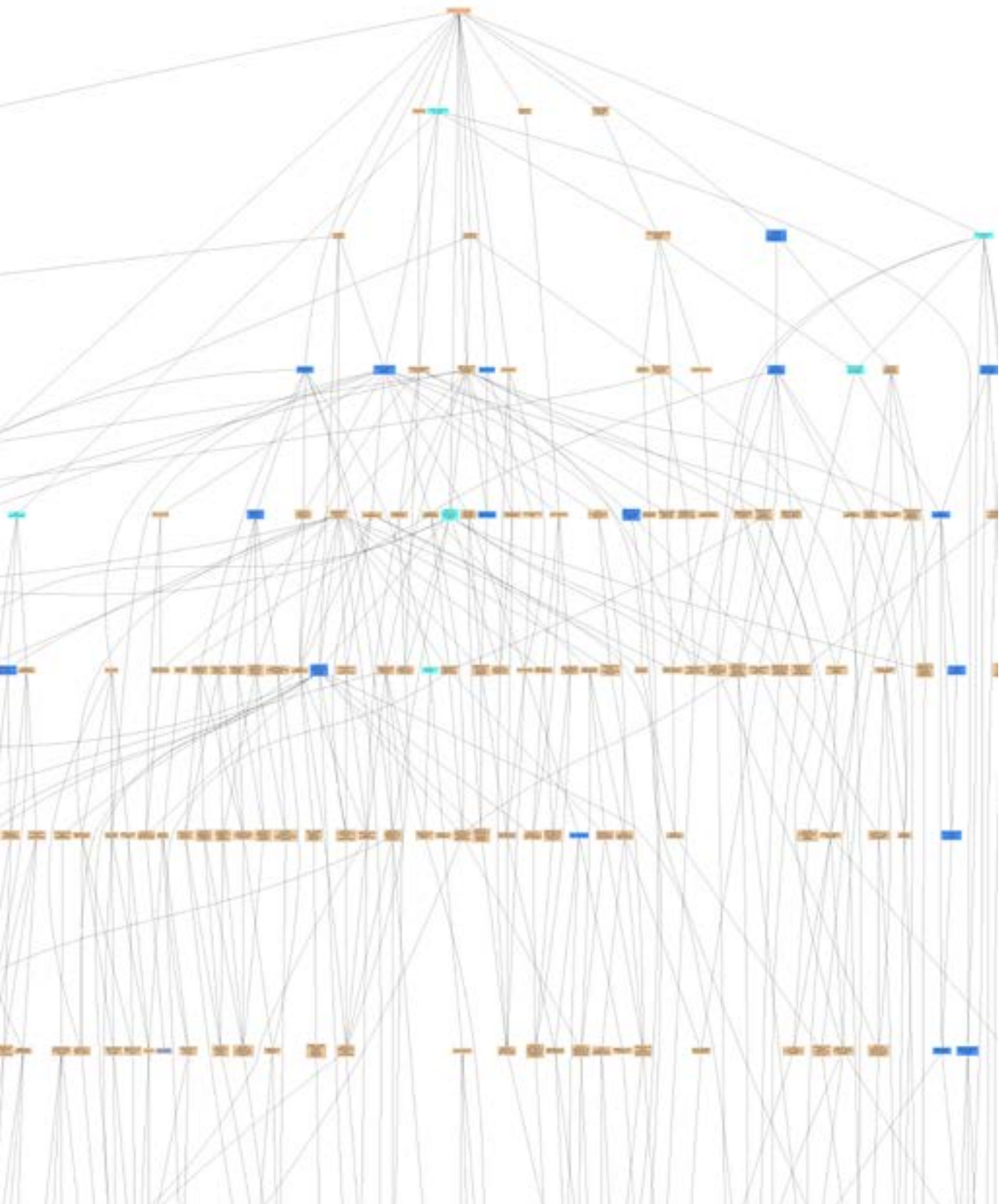












8. SINOPSI DEL PERFIL D'EXPRESSIÓ GÈNICA I DELS PROCESSOS BIOLÒGICS DE CADA CONDICIÓ EXPERIMENTAL

Es van estudiar els patrons d'expressió gènica per cada condició experimental en funció dels processos biològics en els que estaven implicats els gens sobrerregulats més de 2 vegades i els gens infrarregulats:

La comparació dels GAD de les extremitats lesionades dels animals ICR-STZ vs ICR no va mostrar diferències en l'expressió gènica, pel que es va descartar que la STZ tingues un efecte neurotòxic a les 8 setmanes d'inici de la diabetis.

La comparació dels GAD de les extremitats lesionades vs les no lesionades dels animals ICR va mostrar que els gens amb expressió diferencial més marcada pertanyien als següents processos biològics: desenvolupament del sistema nerviós (Sox11, Atf3, Gal, Sprr1a); senyalització cel·lular (Nts, Gpr151); transmissió sinàptica (Npy); adhesió cel·lular i reorganització del microambient local de la matriu extracel·lular (Lmo7, Loxl2, Flrt3, Mmp16 i gens associats al col·lagen: Col18a1, col8a1; col3a1, Col5a2); transport de substàncies (Cacna2d1, Slc15a3, Slc15a9, Slc6a4) i apoptosi (Phb, Comp, Crh). Aquests resultats van permetre identificar processos de regeneració posttraumàtica del nervi ciàtic en animals sans.

La comparació dels GAD de les extremitats no lesionades dels animals diabètics Tg-STZ vs les extremitats no lesionades dels animals ICR va mostrar que els gens amb expressió diferencial més marcada pertanyien als següents processos biològics infrarregulats: transport de substàncies (canals de potassi: Kcnq5, Kcnj13, Kcns1, Kcna6, Kcnt1); desenvolupament del sistema nerviós (Sppr1a, Gal, Bdnf, Egr3, Lingo1); senyalització cel·lular (Nts, Rgs2); transmissió

sinàptica (Snapin, Calb1) i apoptosi: (Tfnaip, Ctsb, E2f1, Crh). Per contra, gens associats al processos metabòlics estaven sobrerregulats (Gdpd3, Car3). Aquests resultats van permetre identificar processos de degeneració nerviosa deguda a la PND i els desordres metabòlics que provoca la DM.

La comparació dels GAD de les extremitats lesionades dels animals diabètics Tg-STZ vs les extremitats lesionades dels animals ICR va mostrar que els gens amb expressió diferencial més marcada pertanyien als següents processos biològics sobrerregulats: desenvolupament del sistema nerviós (Sox11, Sprr1a, Gal, Mapk8 i Foxd1); vies de senyalització nerviosa (Gpr151, Npy1r, Igf1, Rgs18); transmissió sinàptica (Cckbr, Neto1, Gabrb3), reorganització de la matriu extracel·lular (Mmp16, Tgfb1) i apoptosi (Crh). Per contra, els gens associats a processos biològics que estaven infrarregulats van ser: transport de substàncies (Htr3a, Tnpo, Mlc1, Slc15a2) i desenvolupament del sistema nerviós (Egr3, Nptx1, Cxcr4). Aquests resultats, comparats amb els obtingut amb els animals control, van permetre identificar un cert retràs en els processos de regeneració nerviosa posttraumàtica 4 setmanes després de la lesió en els animals diabètics.

Així mateix, aquests animals diabètics mostraven una sobreexpressió de gens relacionats amb el dolor neuropàtic (Gal i Npy1r), el qual podria estar relacionat amb la pèrdua de sensibilitat al dolor que s'observa en els pacients amb PND.

9. VALIDACIÓ DELS RESULTATS DELS MICROARRAYS MITJANÇANT RT-QPCR

Per validar els valors de l'expressió gènica obtinguts mitjançant la tècnica de *microarrays*, es va realitzar la tècnica de RT-qPCR.

Es va testar el nivell d'expressió dels gens *Atf3*, *Gal*, *Npy* i *Nts* en tots els grups d'animals, 30 animals per grup.

Els resultats van ser una ratio que comparava el valor de cada una de les mostres amb la mitjana dels valors del grup de les extremitats no lesionades dels animals ICR.

9.1. RT-QPCR DELS GAD DE LES EXTREMITATS LESIONADES EN ANIMALS ICR

El nivell d'expressió dels gens dels GAD de les extremitats lesionades dels animals ICR mitjançant RT-qPCR va ser: 5,84 per Atf3, 6,57 per Gal, 6,41 per Npy i 8,54 per Nts. Es va confirmar la sobrerreguació ja que es van obtenir valors de FC amb una forta concordança amb els obtinguts mitjançant els microarrays (Fig25).

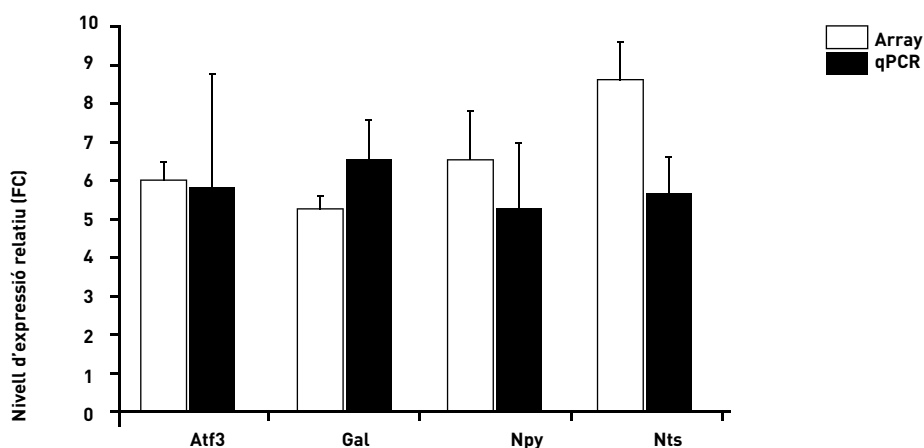


Figura 25. Expressió obtinguda per RT-qPCR i per *microarrays* dels GAD de les extremitats lesionades dels animals ICR mitjançant RT-qPCR. L'expressió gènica d'Atf3, Gal, Npy i Nts es va detectar mitjançant RT-qPCR (negre) i es compara amb les dades dels *microarrays* (blanc). Els valors consisteixen en la mitjana del FC de 3 *microarrays* o trípliques de mostres de cDNA que provenen d'un pool de mostres de RNA (mirar materials i mètodes) 3 la desviació estàndard (DS).

Per Atf3 i Npy el resultat no es va demostrar estadísticament degut a la gran desviació estàndard de les mostres de la RT-qPCR, que va ser 3,16 per les mostres d'ATf3 i 1,84 per les mostres de Npy.

9.2. RT-QPCR DELS GAD DE LES EXTREMITATS NO LESIONADES DELS ANIMALS TG-STZ

El nivell d'expressió dels gens dels GAD de les extremitats no lesionades dels animals Tg-STZ mitjançant RT-qPCR va ser: 0,56 per Atf3, 0,61 per Gal, 0,83 per Npy i 0,02 per Nts. Es va confirmar la infrarregulació d'aquests gens ja que es van obtenir valors de FC amb una forta concordança amb els obtinguts mitjançant els microarrays (Fig26).

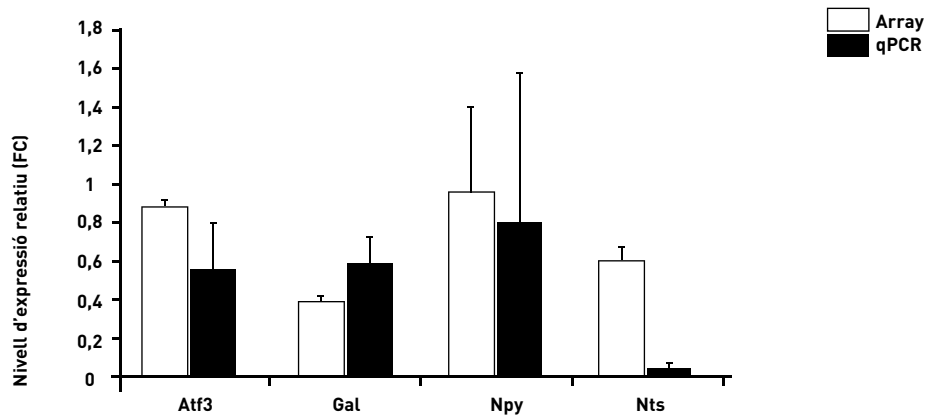


Figura 26. Expressió obtinguda per RT-qPCR i per *microarrays* dels GAD de les extremitats no lesionades del grup Tg-STZ mitjançant RT-qPCR. L'expressió gènica d'Atf3, Gal, Npy i Nts es va detectar RT-qPCR (negre) i es compara amb les dades dels *microarrays* (blanc). Els valors consisteixen en la mitjana del FC de 3 *microarrays* o trípliques de mostres de cDNA que provenen d'un pool de mostres de RNA (mirar materials i mètodes) 3 la desviació estàndard (DS).

Els resultats es van poder confirmar estadísticament en tots els casos.

9.3. RT-QPCR DELS GAD DE LES EXTREMITATS LESIONADES DELS ANIMALS TG-STZ

El nivell d'expressió que es va obtenir dels gens dels GAD de les extremitats lesionades dels animals Tg-STZ mitjançant RT-qPCR va ser: 7,15 per Atf3, 11,57 per Gal, 11,27 per Npy i 9,99 per Nts. Es va confirmar la sobrerregulació d'aquests gens ja que es van obtenir valors de FC amb una forta concordança amb els obtinguts mitjançant els microarrays (Fig27).

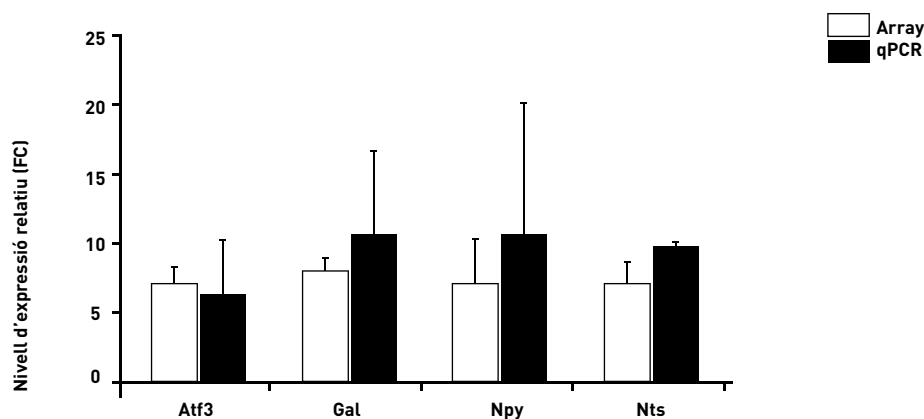


Figura 27. Expressió obtinguda per RT-qPCR i per *microarrays* dels GAD de les extremitats lesionades dels animals Tg-STZ mitjançant RT-qPCR. L'expressió gènica d'Atf3, Gal, Npy i Nts es va confirmar mitjançant RT-qPCR (negre) i es compara amb les dades dels *microarrays* (blanc). Els valors consisteixen en la mitjana del FC de 3 *microarrays* o trípliques de mostres de cDNA que provenen d'un pool de mostres de RNA (mirar materials i mètodes) 3 la desviació estàndard (DS).

Per Atf3, Gal i Npy el resultat no va poder ser demostrat estadísticament degut a la gran desviació estàndard de les mostres de la RT-qPCR, que va ser de 3,98 per Atf3, 6,70 per Gal i 10,54 per Npy

Els resultats no van poder ser demostrats estadísticament per la gran desviació estàndard de les mostres de la RT-qPCR. A més a més, va influir-hi la sensibilitat de la reacció i que l'origen de les mostres a partir del que es crea el cDNA era un pool de 10 animals. A pesar de tot, totes les reaccions van seguir la mateixa tendència que l'anàlisi dels microarrays.

VI. DISCUSSIÓ

La PND és una complicació freqüent de la DM que té una implicació important en la morbiditat o en el maneig efectiu dels pacients diabètics. La patogènia de la PND és multifactorial i encara està poc clara. Per aquesta raó són necessaris estudis que identifiquin els mecanismes implicats amb la finalitat d'establir possibles dianes terapèutiques (Sima, 2003; Vinik et al, 2004; Obrosova, 2008; Tomlinson i Gardiner, 2008; Forbes i Cooper, 2013). Els models animals són molt útils per investigar els mecanismes involucrats tant en el desenvolupament com en la dificultat de regeneració nerviosa en la PND. Tot i que cada model ofereix diferents avantatges, no n'hi ha cap que reproduïxi completament la malaltia humana.

Els rosegadors tractats amb STZ són el model experimental més utilitzat per a estudiar la DM i les seves complicacions secundàries (Rees i Alcolado 2005; Sigaudou-Roussel et al, 2007). S'ha discutit l'ús d'animals amb DM induïda mitjançant STZ com a model per a l'estudi de la PND, ja que la STZ té un efecte neurotòxic sobre les neurones sensibles, especialment si els animals es tracten amb dosis altes de STZ (Sullivan et al, 2007; Pabbidi et al, 2008). El model transgènic de ratolí RIP/INF β creat al CBATEG (UAB, Barcelona) pel grup de la Dra. Fàtima Bosch és més susceptible que els ratolins *wild type* a desenvolupar DM de tipus I després de ser injectats amb múltiples dosis baixes de STZ (Pelegrín et al, 1998; Salavert, 2003; Domènech et al, 2011; Molín, 2011).

Els ratolins transgènics RIP/INF β amb *background* genètic CD1, 4 mesos després d'un tractament amb múltiples dosis baixes de STZ, desenvolupen insulinitis i hipoinsulinèmia i presenten hiperglucèmia, glucosúria, una poliúria clínica manifesta, polidípsia, polifàgia i disminució del guany de pes corporal (Casellas et al, 2006).

Per a caracteritzar la PND en el model d'animal transgènic RIP/INF β tractat amb múltiples dosis baixes de STZ, el nostre grup va demostrar, mitjançant estudis

electrofisiològics i morfològics, evidències de regeneració nerviosa posttraumàtica, observant clústers de neurites regenerant i petites fibres remielinitzades a les 4 setmanes després d'una lesió nerviosa per aixafament del nervi ciàtic, posant en evidència que aquest model era d'utilitat per estudiar la neuropatia diabètica (Serafin et al, 2010).

En aquest treball de tesi doctoral, a l'estudiar l'expressió gènica dels GAD s'han identificat gens que codifiquen per molècules que poden estar implicades en la regeneració nerviosa posttraumàtica en les extremitats lesionades dels animals sans ICR i dels diabètics Tg-STZ, i per molècules que poden estar implicades en la degeneració nerviosa deguda a la PND en de les extremitats no lesionades dels animals diabètics Tg-STZ.

El valor de l'expressió gènica que es va prendre com a referència en tot l'estudi va ser el dels GAD de l'extremitat no lesionada dels animals ICR que va ser normalitzat a un FC de 1. Un cop identificats els gens implicats s'han establert els processos biològics i les vies que s'hi troben implicades.

La regeneració de les neurites és un procés complicat que requereix 2 sistemes bidireccionals de comunicació, que han de funcionar durant un llarg temps i en un ambient determinat (Rossi et al, 2007). En primer lloc, necessita la coordinació del metabolisme neuronal i la síntesi proteica, processos que tenen lloc principalment al soma de la neurona, per alliberar proteïnes i metabòlits als axons en regeneració (Rossi et al, 2007). En segon lloc, senyals que activen la regeneració i modifiquen l'expressió gènica des del lloc de la lesió cap al cos de la neurona fins que la reparació sigui completada (Hoffman, 2010). La resposta neuronal dels GAD davant de la lesió depèn tant dels programes intrínsecs com dels senyals que provenen del medi circumdant (Szpara, et al, 2007). Dins del soma neuronal, aquest procés tant complex requereix la sobreexpressió de factors de transcripció

específics, elements del citoesquelet, components del con de creixement i mediadors de les senyals de transducció (Rossi, et al, 2007). Aquests processos canvien en funció del temps i de l'extensió de la lesió i poden ser utilitzats com a importants dianes terapèutiques en els malalts amb PND.

Un cop realitzat l'anàlisi de l'expressió gènica en els GAD de les extremitats no lesionades i lesionades dels animals ICR i Tg-STZ, la discussió es farà segons els processos biològics que s'ha vist que poden estar implicats en la degeneració nerviosa i en el dèficit de regeneració nerviosa de la PND.

SENYALITZACIÓ

La senyalització és el procés biològic que inclou el major nombre de gens sobre o infrarregulats (13,27%) en els GAD de les extremitats lesionades dels animals ICR controls. Alguns dels gens sobrerregulats implicats en regeneració són els receptors acoblats a proteïnes G, la neurotensina i el gens involucrats en vies de senyalització de neuropèptids, també s'han descrit sobrerregulats en diversos models animals o en cultius cel·lulars (Marondel et al, 1996; Sheward et al, 1998; Vincent et al, 1999; Costigan et al, 2002; Katsanos et al, 2008; Nagata et al, 2010; Zhang et al, 2013).

En els animals Tg-STZ diabètics, molts gens expressats tant en els GAD de les extremitats lesionades com en les no lesionades, pertanyen a aquest procés. En els GAD de les extremitats no lesionades els gens relacionats amb senyalització apareixen infrarregulats, el que demostra que aquestes vies estan inhibides i podrien estar implicades en la degeneració nerviosa. En canvi, en els GAD de les extremitats lesionades molts dels gens sobrerregulats més de dues vegades estan associats a vies de senyalització, fet que indicaria que el procés de regeneració nerviosa posttraumàtica encara està actiu.

En els GAD dels animals diabètics Tg-STZ, també trobem expressió de gens que codifiquen per receptors acoblats a proteïnes G, per exemple Gpr151 i Rgs18. S'ha descrit que Rgs18 juga un paper important en la proliferació, diferenciació i/o migració dels megacariòcits (Nagata et al, 2010) i s'expressa a la medul·la òssia (Park et al, 2001), però no hi ha cap descripció de la seva expressió en els GAD del nervi ciàtic. En els animals diabètics, Rgs18 es troba sobrerregulat més de 2 vegades tant en els GAD de les extremitats lesionades com les no lesionades. Es desconeix quina seria la seva funció en aquesta localització, però podria estar vinculat al procés diabètic.

El gen del receptor 1 del neuropèptid Y (Npy1r), es troba sobreexpressat en les extremitats lesionades dels animals Tg-STZ diabètics. En canvi, en les extremitats lesionades dels animals ICR control se sobreexpressa el neuropèptid Y (Npy). Npy s'havia detectat en cultius cel·lulars de GAD on s'estudiava l'orientació de l'axó i la neurogènesi (Kerekes et al, 2000; Hökfelt et al, 2008). El fet de que en els animals Tg-STZ diabètics del nostre estudi estigui sobreexpressat el receptor 1 per Npy a les 4 setmanes post lesió, tot i que no ho estigui el seu lligand Npy, pensem que podria indicar un procés actiu de neurogènesi.

En els GAD de les extremitats no lesionades dels animals Tg-STZ diabètics, *Insulin-like growth factor 1* (Igf1) s'expressa a nivell de *baseline* i se sobreexpressa més de dues vegades en les extremitats lesionades. S'han descrit múltiples rols d'aquest factor de creixement, alguns d'ells associats a la DM, com la proliferació i diferenciació de les cèl·lules β (Font de Mora et al, 2003), o que inhibeix la producció d'hormona del creixement per part de la hipòfisi (Stefaneau et al, 1999). Per altra banda, se li ha atribuït un paper en la diferenciació de neurones i cèl·lules glials (Vicario-Abejón et al, 2003) i en la inducció del creixement de les neurites del nervi perifèric d'embrions de pollastre *in vitro* (Caroni i Grandes, 1990). Segons els resultats

del nostre estudi, Igf1 sembla que podria tenir un paper relacionat amb la regeneració nerviosa en els animals Tg-STZ diabètics.

Tenint en compte que la reparació nerviosa encara està activa a les 4 setmanes després de la lesió, era d'esperar trobar diferències en la transducció de les senyals ja que una bona reparació requereix senyalització bidireccional per coordinar els processos de comunicació. El fet que els gens de senyalització estiguin expressats en els GAD del nervi ciàtic lesionat en els animals Tg-STZ diabètics i no en els animals controls, confirma que, a les 4 setmanes després de la lesió, el procés de regeneració nerviosa està actiu. Això es podria explicar perquè el procés de regeneració s'ha iniciat més tard en animals Tg-STZ diabètics.

DESENVOLUPAMENT DEL SISTEMA NERVIÓS

Com a resposta a una lesió per aixafament o a una axotomia en un nervi perifèric, a la part més distal del nervi hi ha degeneració Walleriana i a la proximal comença la regeneració nerviosa. Com a conseqüència, la lesió indueix la sobreexpressió als GAD de gens essencials per a que es restauri eficientment l'estructura i la funció nerviosa (Costignan et al, 2002; Xiao et al, 2002; Makwana i Raivich, 2005).

En els GAD de les extremitats lesionades i no lesionades dels animals ICR control i els Tg-STZ diabètics, s'ha observat l'expressió d'un gran grup de gens relacionats amb el desenvolupament del sistema nerviós, com axogènesi, creixement de les projeccions neuronals, orientació de l'axó, regeneració axonal i vies de neurogènesi. La majoria d'aquests gens en les extremitats lesionades dels animals ICR controls tenen una expressió moderada de *fold-change*, i en els animals Tg-STZ diabètics es troben infrarregulats en les extremitats no lesionades i en general marcadament sobreexpressats en les extremitats lesionades. En les extremitats lesionades dels animals ICR hi ha dos

gens sobreexpressats reguladors de la transcripció que són importants en la reparació del nervi: *activating transcription factor 3* (Atf3) i *SRY-box containing gene 11* (Sox11). Atf3, Sox11 i l'oncogen *jun* (Jun) codifiquen per factors de transcripció que tenen certa influència en l'extensió de la neurita i s'ha descrit que una lesió en el SNP fa augmentar la seva expressió (Hoffman, 2010).

Atf3 controla el programa de transcripció de la regeneració nerviosa (Seijffers, et al., 2006; Patodia i Raivich, 2012) i la seva expressió és induïda en cultius cel·lulars de GAD de ratolins després de dany axonal perifèric (Bonilla et al, 2002; Seijffers, et al., 2007; Saito i Dalhin, 2008; Reid, et al., 2010). També s'ha descrit que l'expressió d'Atf3 en els GAD, després de la lesió per aixafament del nervi ciàtic, es troba en el seu punt màxim 3 dies després de la lesió i va disminuint gradualment fins arribar al seu nivell normal a les 12 setmanes (Kataoka, et al., 2007). Per això és coherent que Atf3 estigui sobrerregulat 4 setmanes després de la lesió nerviosa per aixafament del nervi ciàtic dels animals ICR. En el model de rates diabètiques Wistar s'ha descrit que en el nervi ciàtic hi ha sobreexpressió d'Atf3 en les cèl·lules de Schwann pròximes al lloc de la lesió 6 dies després d'una axotomia, tot i que no s'observa elongació del nervi lesionat (Stenberg et al, 2012). Per contra, en el nostre estudi, Atf3 en condicions de diabetis no apareix en el perfil d'expressió gènica en els GAD.

Sox11 s'expressa a nivells alts en neurones sensibles en desenvolupament on s'hipotetitza que controla la supervivència de les neurones, la seva proliferació i el creixement de l'axó (Kuhlbrodt et al, 1998; Potzner et al, 2010; Lin et al, 2011; Patodia i Raivich, 2012). Hi ha estudis que demostren que l'absència de Sox11 inhibeix el creixement de les neurites *in vitro* i la regeneració *in vivo* (Jankowsky et al, 2006). L'expressió de Sox11 és baixa en les neurones adultes, però la seva expressió s'indueix de manera intensa després d'una axotomia en les neurones de les arrels sensibles (Tanabe et al, 2003; Jankowski et

al, 2006). Cal tenir en compte que Sox11 pot interactuar amb Atf3 incrementant la seva funció (Hoffman, 2010; Jankowski et al, 2009). En els nostres resultats detectem sobreexpressió de Sox11 en els GAD de les extremitats lesionades dels animals Tg-STZ diabètics i menys marcada en les dels animals ICR. No detectem expressió diferencial de Sox11 entre les extremitats no lesionades dels animals Tg-STZ diabètics i els ICR, és a dir que Sox11 no sembla estar vinculat al procés de degeneració nerviosa per causa de la diabetis però sí implicat en la capacitat de regeneració nerviosa dels animals diabètics.

L'expressió de *Small-proline-rich repeat protein 1A* (Sprr1a) augmenta marcadament com a resposta a una lesió del nervi ciàtic (Bonilla et al, 2002; Starkey et al, 2009). El pic en l'expressió d'Sprr1a es dona 1 setmana després del dany en els GAD del SNP (Bonilla et al, 2002), i retorna al nivell basal 30 dies després de la lesió (Starkey et al, 2009). S'ha descrit que Sox11 pot accelerar la regeneració nerviosa, i aquesta funció depèn de la activació prèvia de la transcripció de Sprr1a (Jing et al, 2012). Sprr1a apareix sobrerregulat en els GAD de les extremitats lesionades dels animals ICR a les 4 setmanes després de la lesió nerviosa. Resultats similars s'han descrit en els GAD L2 i L3 del nervi safè 12 dies després d'una lesió per aixafament, on s'observa sobrerregulació del gen Sprr1a relacionat amb regeneració nerviosa (Jing et al, 2012).

Sprr1a, en els animals diabètics, apareix infrarregulat en els GAD de les extremitats no lesionades, i molt sobrerregulat en les lesionades. Aquestes diferències d'expressió entre animals ICR controls i els Tg-STZ diabètics indicarien que a les 4 setmanes després de la lesió l'estímul funcional de la regeneració de les neurites es manté, i confirmaria un cert alentiment en l'inici de la regeneració nerviosa degut a la PND.

Brain derived neurotrophic factor (Bdnf) és un factor de creixement neurotròfic que té efectes en la supervivència i el desenvolupament neuronal (Ernfors et al, 1995; Staecker

et al, 1996), en la migració i la diferenciació morfològica i bioquímica de les neurones, en la plasticitat sinàptica (Cheng et al, 2003; Gorski et al, 2003;) i en la regeneració neuronal (Ernsberger, 2009; Patel i Krimm, 2010, Valdes-Sanchez et al, 2010). La senyal de Bdnf és necessària per promoure la guia de l'axó de les neurones sensibles cranials (Tesarollo et al, 2003) i per promoure el creixement de fibres aferents en altres teixits diana (Hellard et al, 2004). La sobreexpressió de Bdnf s'ha descrit a les cèl·lules de Schwann de nervis en degeneració Walleriana entre 1 i 2 setmanes després d'una lesió nerviosa per aixafament (Zhang et al, 2000). S'ha descrit també que Sox11 modula la transcripció de Bdnf, i que Bdnf es troba elevat en els GAD després d'una lesió nerviosa (Salerno et al, 2012). En els nostres resultats, Bdnf apareix infrarregulat en els GAD de les extremitats no lesionades dels animals Tg-STZ diabètics per tant podria estar relacionat amb el procés de degeneració nerviosa i el desenvolupament de la PND. En els GAD de les extremitats lesionades dels animals ICR controls i dels Tg-STZ diabètics apareix a nivell del *baseline*, indicatiu de que a les 4 setmanes ja ha tornat a nivells normals degut a que no hi ha estímuls o si hi son es troben al lloc de la lesió.

La galanina (Gal), és un neuropèptid que juga un paper important en la supervivència de les neurones dels GAD i que augmenta la longitud de les neurites (Mahoney et al, 2003). Xiao i col·laboradors (2002) van demostrar que als 28 dies després d'una axtomia, Gal es trobava sobrerregulat. En el nostre estudi, el gen que codifica per aquest neuropèptid es troba sobreexpressat en els animals controls ICR i ho està molt més en els animals Tg-STZ diabètics. Per contra, en els GAD de les extremitats no lesionades dels animals diabètics, l'expressió de galanina està fortament disminuïda, suggerint una implicació en el procés de PND.

Les semaforines són factors associats a la mielina, i junt amb les tenascines, són considerades molècules

inhibidores del creixement (Rosi et al, 2007). Es depositen a la matriu extracel·lular i en les xarxes perineuronals des d'on restringeixen la plasticitat neurítica. Són molècules que es mantenen en el sistema nerviós adult, regulen la mielinització, controlen la diferenciació dels oligodendròcits (Bernard et al, 2012) i inhibeixen el creixement de les neurites i la regeneració en el SNC (Rosi et al, 2007). En els animals control ICR l'expressió d'aquests gens està sobrerregulada, indicant que a les 4 setmanes després de la lesió nerviosa el procés de regeneració deu estar gairebé completat. L'absència d'expressió d'aquests gens en els perfils de les comparatives de les extremitats lesionades i no lesionades dels animals Tg-STZ diabètics *versus* els ICR indicaria que Tnc i Sema6a permeten la regeneració en els animals diabètics

Alguns gens infrarregulats en els GAD de les extremitats lesionades i de les no lesionades dels animals Tg-STZ diabètic són *early growth response 3* (Egr3), relacionat amb la transmissió sinàptica en el fus neuromuscular; la pentraxina neuronal (Nptx) i el subtipus Nptx1. Nptx és una proteïna de fase aguda del sistema immunitari que s'associa amb la plasticitat sinàptica en la retina i en el nucli geniculat dorso-lateral (Bjartmar et al, 2006). Egr3 intervé en la transmissió sinàptica neuromuscular, i s'ha descrit la reducció del diàmetre dels axons fusimotors de les arrels ventrals de L4 en un model de ratolí transgènic que no expressa aquest gen (Whitehead et al, 2005). La manca d'expressió d'aquest gen en els GAD de les extremitats no lesionades dels animals diabètics, pot tenir un paper en la dificultat de la transmissió sinàptica en la PND. Egr3 també està relacionat amb altres factors tròfics com BDNF, neurotrofines i IGF1 (Whitehead et al, 2005), en els nostres resultats però, Egr3 apareix infrarregulat en els GAD de les extremitats lesionades tant dels animals controls com dels diabètics, suggerint que 4 setmanes després d'una lesió no té un paper funcional en la regeneració nerviosa.

Lingo1 protegeix les neurones dopaminèrgiques davant de la degeneració (Inoue et al, 2007; Lv et al, 2010) i participa en la inhibició de la diferenciació dels oligodendròcits (Mi et al, 2005). En els animals Tg-STZ diabètics Lingo1 està infraexpressat en els GAD de les extremitats no lesionades suggerint que la seva inhibició podria contribuir a la degeneració nerviosa en la PND.

Chemokine (C-X-C motif) receptor 4 (Cxcr4) és un receptor de citocines acoblat a proteïna G important per la migració neuronal (Zou et al, 1998; Molyneaux, et al, 2003). Cxcr4 ajuda a determinar la trajectòria inicial de l'axó en les neurones motores dels mamífers (Lieberam et al, 2005). En els GAD de les extremitats lesionades dels animals Tg-STZ diabètics Cxcr4 apareix infrarregulat, i a nivell de baseline en les extremitats lesionades dels animals ICR. El procés de determinació de la trajectòria de l'axó ja s'hauria dut a terme en els animals ICR, mentre que en els animals Tg-STZ diabètics el dèficit en la regeneració nerviosa podria estar explicat, en part, per la infraexpressió de Cxcr4.

Els gens Sox11, Sprr1a i Gal relacionats amb el desenvolupament del sistema nerviós que hem trobat sobrerregulats en els Tg-STZ indicant que són claus en el procés d'activació dels GAD i la regeneració de les neurites després d'una lesió. La marcada sobrerregulació en els GAD dels nervis lesionats dels animals Tg-STZ diabètics suggereix que el procés de regeneració encara es troba actiu a les 4 setmanes després d'una lesió traumàtica en el nervi ciàtic en comparació amb els animals normals.

Els gens Egr3, Nptx i Bdnf que hem trobat infrarregulats en els GAD dels nervis no lesionats dels animals diabètics podrien estar implicats directament en el procés de degeneració nerviosa causat per la PND.

DOLOR NEUROPÀTIC

El dolor neuropàtic és comú en els pacients diabètics (Kamiya et al, 2005; Tomlinson i Gardiner, 2008). La degeneració de les fibres sensibles en els nervis perifèrics té un paper important en la generació del dolor (Kamiya et al, 2005). Gens associats amb el dolor neuropàtic, com Npy, Npy2r i Gal estan sobrerregulats tant en els GAD de les extremitats lesionades dels animals ICR. En els animals diabètics també s'hi sobreexpressa el receptor 1 de Npy (Npy1r) però no el lligand Npy. La sobrerregulació d'aquests gens suggereix la persistència d'algun tipus d'estímul dolorós en els GAD a les 4 setmanes després de la lesió nerviosa. Npy, està involucrat en l'orientació de l'axó (Hökfelt, et al., 2008), però quan apareix coexpressat amb el seu receptor Y2 (Npy2r), es manifesta un dolor sostingut (Xiao, et al., 2002), tot i així el paper que juga en la modulació del dolor, no està del tot definit (Son, et al, 2007; Sapunar et al, 2011; Kostic et al 2013). De totes maneres, tenint en compte que en estadis avançats de la PND es pot perdre l'estímul dolorós, l'expressió de Npy en els GAD de les extremitats lesionades dels animals ICR i l'absència en les extremitats lesionades i no lesionades dels animals Tg-STZ, pot suggerir que en el nostre model de ratolins Tg-STZ la infrarregulació de Npy està relacionat amb la pèrdua de la sensibilitat al dolor degut a la PND.

En models animals de “dany en el sistema nerviós perifèric”, quan s'indueix el dolor neuropàtic, s'ha descrit una sobrerregulació de Gal en els GAD (Mahoney, et al., 2003), ja que juga un paper antinociceptiu a l'hora que té una funció neuroprotectiva i pro-regenerativa (Pope, et al, 2010; Xu et al, 2012). Hi ha una correlació directe entre l'extensió de la lesió, la durada del dolor i el nivell de sobrerregulació de la Gal (Mahoney, et al., 2003). Gal juga un paper addicional en la supervivència d'algunes de les neurones dels GAD, com per exemple les petites neurones peptidèrgiques, que són nociceptores (Holmes et al, 2000). En els nostres resultats, la Gal està sobreexpressada

en els GAD de les extremitats lesionades dels animals ICR (FC de 5,14) i encara ho està més en les extremitats lesionades dels animals Tg-STZ diabètics (FC de 8,57); suggerint que s'està produint una resposta davant de l'estímul dolorós de la lesió nerviosa per aixafament, i que aquest és més accentuat en els animals Tg-STZ.

La sobrerregulació de nombrosos gens associats a nocicepció en els GAD de les extremitats lesionades dels animals ICR suggereix que, a les 4 setmanes després d'una lesió nerviosa per aixafament, encara hi ha estímuls dolorosos en aquests animals. Per altra banda, l'absència de Npy en els animals Tg-STZ podria indicar que aquests animals estan perdent la sensibilitat al dolor degut a la PND.

TRANSMISSIÓ SINÀPTICA

La transmissió sinàptica és el procés de comunicació des d'una neurona fins al seu receptor (*target* -diana-) a través de la sinapsi. Per aquesta raó, lesions a la neurita, com el *crush*, dona senyals de denervació, ja que desconnecta el flux retrògrad de senyals des del lloc d'innervació habitual (Hanz i Fainzilber, 2006; Raivich i Makwana, 2007).

El neuropèptid Y (Npy) és important per la supervivència de les neurones i el procés de regeneració nerviosa, on actua com a molècula transmissora i pot tenir accions tròfiques (Hökfelt, et al., 2008). Hem detectat un increment de l'expressió gènica de Npy en GAD de nervis lesionats en els animals ICR, i no s'havia descrit la seva presència en estudis *in vivo* a les 4 setmanes després d'una lesió nerviosa.

Npy a nivell espinal actua com a molècula transmissora i té accions tròfiques, similars als factors de creixement; Npy promou el creixement i atrau als cons de creixement en les neurones embrionàries dels GAD, aquest efecte d'atracció és el mateix que produeix en menor grau Igf1 (Hökfelt et al, 2008; Sanford et al, 2008).

La desconexió del flux retrògrad de senyals des del lloc de la lesió és la resposta primària, aguda, i assumim que, a temps més tardans com 4 setmanes després de la lesió per aixafament del nervi ciàtic, la transmissió sinàptica ja s'hauria d'haver resolt i que el perfil d'expressió gènica associat ja hauria retornat al nivell d'expressió basal. Els nostres resultats indiquen que la transmissió sinàptica encara està activa en els GAD de les extremitats lesionades dels animals Tg-STZ diabètics i controls ICR, on els gens, encara estan sobreexpressats.

Un dèficit del receptor gabaèrgic $\beta 3$ (Gabbrb3) provoca signes de neuropatia, disminució de la densitat d'innervació aferent i disminució de la resposta de les neurones sensibles de l'oïda (Maison et al, 2006). En els animals ICR del nostre estudi la seva expressió està a nivell de *baseline*, i sobrerregulada en els GAD de les extremitats no lesionades i lesionades dels animals diabètics; per tant l'augment d'una senyal des del cos neuronal potser és indicatiu d'un intent de revertir la PND.

El gen que codifica pel receptor β de la hormona peptídica colecitoquinina Cck (Cckbr) està molt sobreexpressat en els GAD de les extremitats lesionades dels animals Tg-STZ diabètics, una mica menys en els ICR, i per contra, està infraexpressat en els GAD de les extremitats no lesionades dels animals diabètics. L'augment en l'expressió d'aquest receptor en els GAD ja s'havia descrit anteriorment en rates després d'una axotomia en el nervi ciàtic (Antunes-Bras et al, 1999).

El mateix perfil d'expressió gènica que la Cckbr trobem amb el gen Neto1. Neto1 participa en la plasticitat sinàptica a llarg termini i la seva presència en el SN s'ha descrit relacionat amb processos d'aprenentatge (Ng et al, 2009), però no s'havia descrit abans la seva expressió en els GAD de nervis en regeneració, suggerint que Neto1 participaria en la regeneració nerviosa està retardada en els animals Tg-STZ.

MATRIU EXTRACEL·LULAR

En els GAD es produeixen factors de creixement que són dirigits a la cèl·lula diana corresponent, com per exemple les molècules de la matriu extracel·lular per a facilitar l'extensió dels axons de les neurones (Hari et al, 2004).

La sobrerregulació de gens associats amb la membrana basal, la matriu extracel·lular, com *Tgfb1*, *Loxl*, *Dsp*, i l'adhesió cel·lular, *Flrt3* i *Lmo7*, en els GAD de les extremitats lesionades dels animals ICR i Tg-STZ diabètics a les 4 setmanes després del *crush*, suggereix que encara hi ha processos de remodelació de l'ambient local, controlat pels GAD, que permetran l'extensió de les neurites.

Així mateix, la sobreexpressió de gens que codifiquen pel col·lagen o per les metal·loproteïnases de la matriu (MMPs) són troballes importants en el nostre estudi, atès que fins ara sols s'havia descrit *in vitro*, en cultius de cèl·lules embrionàries, la participació de MMPs a les 65 hores després d'una lesió per aixafament nerviós (Szpara et al, 2007). L'expressió dels gens que codifiquen per MMPs està incrementada tant en els animals control ICR, com en els animals diabètics amb lesió al nervi, on encara està més augmentada. Aquests resultats concorden amb estudis on es descriu que l'expressió de MMPs es troba relativament elevada després d'una lesió nerviosa (Fudge i Mearow, 2013) i que aquestes modificacions en la seva expressió són favorables per a la regeneració nerviosa (Gnatus et al, 2006).

La regeneració nerviosa es dona gràcies al microambient permissiu de l'endoneuri i a la interacció entre les cèl·lules de Schwann, la MEC adjacent, els vasos sanguinis i els axons en creixement (Previtali et al, 2008). Tots aquests components participen en una sèrie de processos que permeten la reparació nerviosa (Previtali et al, 2008). En rates amb DM induïda mitjançant tractament de STZ s'ha descrit la glicació de les proteïnes de la MEC i la reducció

del creixement de les neurites estimulat per neurotrofines, fracassant la regeneració axonal (Duran-Jiménez et al, 2009). Segons els nostres resultats, en els GAD de les extremitats no lesionades dels animals diabètics, l'expressió de gens relacionats amb la MEC i l'adhesió cel·lular és irrellevant. Una possible explicació als resultats obtinguts podria ser que en els GAD es troben afectats els enllaços a proteïnes de la MEC i perden funcionalitat, aquesta és una de les causes de la PND (Sango et al, 1999).

Segons els nostres resultats, es pot postular que la reorganització de la MEC encara està activa i controlada en part pels GAD de les extremitats lesionades en animals ICR. Per contra, les molècules de la MEC en els animals que pateixen PND no presentarien activitat, impedit o dificultant el creixement de les neurites i participant en el procés de degeneració.

TRANSPORT

Els canals de K^+ són importants per la regulació del potencial de membrana i per l'alliberament de neurotransmissors de les neurones (Kim et al, 2002; Catacuzzeno et al, 2008). S'ha descrit que una lesió nerviosa traumàtica fa disminuir els nivells d'expressió de gens que codifiquen pels canals de K^+ a les neurones dels GAD (Kim et al, 2002). En fases inicials de PND també es redueix l'activitat dels canals de K^+ a les neurones grans i mitjanes dels GAD (Cao et al, 2010) i es relaciona amb un increment de l'activitat de Bdnf en aquestes mateixes neurones (Cao et al, 2010). Aquestes dades concordarien amb els nostres resultats en els animals Tg-STZ. Els animals ICR mostren infrarregulació del gen per canal de potassi (*Kcnmb1*), i expressió a nivell de baseline de diversos gens que codifiquen per canals de calci (*Cacna2d1*) i per proteïnes de la família dels transportadors de soluts (*Slc15a3*, *Slc6a19* i *Slc6a4*). En una fase inicial de la lesió, la disrupció transitòria de la integritat de la membrana obre l'axoplasma, provoca una entrada ràpida d'ions

extracel·lulars, com Ca^{2+} , i desencadena la despolarització de l'axó (Shim i Ming, 2010). Un control apropiat de les concentracions intracel·lulars de Ca^{2+} i Na^+ sembla ser essencial pel tancament de les membranes del sistema nerviós perifèric (Nehrt, et al, 2007; Kuroda et al, 2013).

Estudis en ratolins demostren que després d'una lesió nerviosa l'expressió gènica dels canals de K^+ està infrarregulada (Navarro et al, 2007), coincidint amb els nostres resultats en els animals controls, i podem assumir que a les 4 setmanes post lesió els canals de K^+ s'han restablert en gran mesura.

En animals Tg-STZ diabètics el procés biològic del transport de substàncies passa a ser un dels que engloba major nombre de gens infrarregulats, tant en els GAD de les extremitats no lesionades com en les lesionades. En l'anàlisi conjunt, el procés biològic que engloba més gens comuns en els animals diabètics és el transport de substàncies. Aquesta troballa suggereix que el transport de substàncies ja s'ha restablert en les extremitats lesionades dels animals Tg-STZ.

En les extremitats no lesionades dels animals Tg-STZ nombrosos gens que codifiquen per proteïnes que activen de manera retardada canals iònics selectius de K^+ es troben infrarregulats, com *Kcnq5*, *Kcns1*, *Kcna6* i *Kcnt1*. Diferents subtipus de canals de K^+ neuronals, contraresten els efectes de la despolarització dels canals de Na^+ i Ca^{2+} i el control l'excitabilitat neuronal (Jensen et al, 2005). Una possible explicació, que caldria estudiar més a fons, és que la disminució de gens que codifiquen per canals de K^+ estigui relacionada amb l'activació de la via del polioli en la PND que provoca una alteració en l'activitat $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPasa}$, i que acabi repercutint en una infraexpressió de canals de K^+ . L'activació de la via del polioli impedeix l'activació de la PKC, a la seva vegada contribueix en bloquejar l'activitat $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPasa}$ en neurones perifèriques (Lattimer et al, 1989), i com a conseqüència hi ha inactivació dels canals de Na^+ que

resulta amb acumulació de Na⁺ intraaxonal i butiment nodal i paranodal (Sugimoto et al, 2000; Mizisin et al, 2002).

Quatre setmanes després de la lesió per aixafament del nervi ciàtic, en els animals Tg-STZ diabètics, s'hi manté un procés de regeneració més actiu que en els animals control ICR, ja que es pressuposa que els animals ICR pràcticament han regenerat el nervi després de la lesió, i que en en els diabètics el procés de regeneració ha començat més tard, confirmant els resultats previs observats mitjançant les proves electrofisiològics (Serafín et al, 2010).

APOPTOSI

En els animals controls ICR hi ha gens infrarregulats com *Comp*, un gen proapoptòtic; i gens sobrerregulats com *Phb*, associat amb regulació negativa de l'apoptosi (Kim et al, 2009), i *Crh*, gen neuroprotector (Hanstein et al, 2009; Kim et al, 2009), suggerint l'existència de processos de neuroprotecció. L'expressió de *Crh* també s'ha relacionat amb la de *Bdnf* i el creixement axonal potstraumàtic en neurones de la medul·la espinal (Yuan et al, 2010). En animals diabètics Tg-STZ els mecanismes de neuroprotecció en els GAD de les extremitats no lesionades estan infrarregulats, ja que no s'observa una expressió diferencial, i estan fortament sobreexpressat en els GAD de les extremitats lesionades en procés de regeneració.

S'ha descrit que l'activació de l'apoptosi en els GAD és un factor important en el desenvolupament de la PND (Russel et al, 1999; Srinivasan et al, 2000) i de l'existència d'un fenotip proapoptòtic en PND (Burnand et al, 2004; Meyer et al, 2004; Kamiya et al, 2005).

En els GAD de les extremitats no lesionades dels animals Tg-STZ diabètics hem trobat el mateix perfil apoptòtic, estan infrarregulats tant els gens proapoptòtics, *Tnfaip* i *E2f1*, com els gens antiapoptòtics, *Ctsb*, *Angpt1* o *Eef1f1*.

Aquests resultats també suggereixen que en animals diabètics l'apoptosi pot estar implicada en el desenvolupament de la PND.

RESPOSTA IMMUNE

El sistema immune juga un paper crucial en l'eliminació de la mielina i altres detritus just després de la lesió (Vargas i Barres, 2007). Al SNP aquesta resposta comença aproximadament el dia 3 després de la lesió i té el seu moment àlgid entre el dia 14 i 21 (Avellino et al, 1995). Sols uns pocs gens involucrats en la resposta immunitària es troben lleugerament sobrerregulats tant en els animals diabètics Tg-STZ com en els ICR, el que suggereix que 28 dies després de la lesió l'eliminació de les restes cel·lulars ja està gairebé resolta, la mielina eliminada i només hi queda una moderada reacció inflamatòria residual. S'ha de tenir en compte que en aquest estudi s'ha estudiat l'expressió gènica en els GAD i no al lloc exacte on es va produir la lesió.

METABOLISME

Vgf és un generador de metabòlits precursors d'insulina que trobem infrarregulat en els GAD de les extremitats no lesionades dels animals Tg-STZ diabètics. La modulació dels nivells de VGF o la seva senyalització pot ser un regulador de la sensibilitat a la insulina i dels nivells de glucosa circulants (Watson et al, 2005). El defecte en la secreció de VGF està relacionat amb la reducció dels nivells de leptina, dels reservoris de greix i l'alteració en la secreció del neuropèptid Y (Hahm et al, 1999; Hahm et al, 2002). Tal i com s'ha discutit anteriorment, en els nostres resultats no es detecta expressió de Npy en els animals Tg-STZ, això pot ser degut a que el defecte en la expressió de Vgf inhibeixi també l'expressió de Npy en els animals diabètics.

L'expressió gènica de la fosfatasa-1 també es troba infrarregulada en els animals Tg-STZ diabètics i s'ha descrit com un component clau per la via de senyalització de la insulina (Ragolia i Begum, 1998).

En animals diabètics trobem sobreexpressió de les anhidrases carbòniques (Car3). Es tracta d'un grup d'enzims involucrats en la conversió ràpida del diòxid de carboni en bicarbonat i protons. Un estudi sobre retinopatia diabètica descriu que la inhibició d'aquests enzims podria ser un possible tractament per aquesta complicació de la diabetis (Weiwei i Hu, 2009). Mai s'havia descrit la expressió de Car3 en GAD de ratolins amb PND, pel que la seva inhibició també podria ser una possible estratègia terapèutica.

El gen que codifica per l'isoenzim 4 de la kinassa piruvat deshidrogenasa (Pdk4) el trobem sobreexpressat més de dues vegades en els GAD dels animals Tg-STZ diabètics, d'acord amb el que s'havia descrit anteriorment, s'ha trobat sobrerregulat en molts òrgans i teixits en resposta a desajustos hormonals com la resistència a la insulina, la DM i l'hipertiroidisme (Wu et al, 1998; Sugden i Holness, 2002).

S'han trobat gens relacionats amb el metabolisme proteic, el dels greixos o el dels hidrats de carboni, ja que el dèficit en la secreció d'insulina provoca alteracions en el metabolisme de hidrats de carboni, lípids i proteïnes. Mizisin i col·laboradors, (1997) van descriure que la sobrerregulació o la infrarregulació de gens relacionats amb el metabolisme és a causa dels desajustos metabòlics que provoca la hiperglucèmia.

Utilitzant tècniques de *microarrays*, en els GAD d'animals diabètics Tg-STZ, 4 setmanes després d'una lesió per aixafament del nervi ciàtic, hem descrit canvis en l'expressió gènica relacionats amb la regeneració nerviosa. Trobem sobrerregulació de gens que codifiquen per neuropèptids involucrats en senyalització i transmissió sinàptica, la majoria d'ells involucrats en desenvolupament del sistema

nerviós. Els gens relacionats amb la regeneració axonal a llarg termini, com *Atf3*, *Sox11*, *Spr1a* o *Bdnf*, es poden considerar com a potencials marcadors per a estudiar els canvis en processos regeneratius del SNP que tenen lloc en pacients humans, com per exemple traumatismes subjacents a neuropaties, diabetis mellitus o esclerosi múltiple.

Els animals transgènics diabètics, en els GAD de les extremitats no lesionades, que sols estan sota l'efecte de la diabetis instaurada fa 8 setmanes, hi ha evidències que ha començat un procés de degeneració nerviosa, ja que processos com el transport de substàncies, la senyalització entre cèl·lules, l'expressió de molècules que intervenen en el desenvolupament del sistema nerviós i en la transmissió sinàptica apareixen marcadament inhibits comparat amb els animals ICR. Es pot afirmar que el ratolí transgènic RIP/ $\text{INF}\beta$ tractat amb dosis baixes i repetides de STZ és un bon model per a l'estudi de la PND.

En el perfil d'expressió gènica dels GAD de les extremitats lesionades dels animals diabètics (Tg-STZ) hi trobem evidències de regeneració nerviosa posttraumàtica ja que hi ha gens fortament sobrerregulats en processos biològics com la transmissió de senyals entre cèl·lules, el desenvolupament del sistema nerviós, la transducció sinàptica i la reorganització del microambient local de la matriu extracel·lular. A les 4 setmanes després de la lesió del nervi ciàtic l'expressió gènica del procés de regeneració nerviosa està molt més marcat en els animals diabètics que en al animals ICR. Podem afirmar que el procés de regeneració nerviosa és més actiu en els animals diabètics RIP/ $\text{INF}\beta$ ja que comença de manera més tardana degut a la diabetis mellitus concomitant. Quan en els animals ICR els nivells d'expressió gènica associats a regeneració nerviosa ja estan retornant a valors propers als dels animals controls ICR no lesionats, els animals diabètics encara tenen els mateixos gens molt sobrerregulats.

L'extensa informació obtinguda en aquest estudi de tesi doctoral, a partir dels GAD del nervi ciàtic en les diverses condicions experimentals (normalitat, diabetis de 8 setmanes d'evolució i regeneració després de 4 setmanes de una lesió per aixafament del nervi ciàtic), amb l'anàlisi de l'expressió gènica mitjançant la tècnica dels *microarrays*, permet obrir diverses línies de recerca. No sols per aprofundir en el coneixement dels mecanismes implicats en la polineuropatia diabètica, sinó també per aportar dades referides a la normalitat dels processos de degeneració i regeneració nerviosa, que poden ser d'interès per estudiar altres tipus de neuropaties. De la mateixa manera, obre un ampli ventall de possibilitat per l'estudi de dianes terapèutiques en les neuropaties.

VII. CONCLUSIONS

Un cop analitzada l'expressió gènica dels GAD del nervi ciàtic, lesionat i no lesionat, de ratolins controls ICR i transgènics Tg-STZ, seleccionats els gens amb expressió diferencial significativa i identificats els processos biològics implicats en la degeneració i regeneració nerviosa 4 setmanes després d'una lesió traumàtica per determinar el paper que hi juga la diabetis, podem concloure que:

- 1) La STZ, 8 setmanes després de començar la diabetis, no té un efecte neurotòxic en els GAD.
- 2) En animals controls ICR, a les 4 setmanes després d'una lesió en el nervi ciàtic, la lesió no està totalment resolta, hi ha regeneració nerviosa i remodelació a la part lesionada.
- 3) En animals transgènics (Tg-STZ) diabètics, 8 setmanes després de començar la diabetis, els GAD mostren trastorns metabòlics deguts a la hiperglucèmia i tenen canvis degeneratius deguts a la neuropatia diabètica.
- 4) En animals transgènics (Tg-STZ) diabètics, 4 setmanes després d'una lesió per aixafament del nervi ciàtic hi ha processos de regeneració posttraumàtica. Degut a la diabetis, l'inici de la regeneració estaria retardada i encara no hauria començat la remodelació local de la part lesionada.
- 5) A les 4 setmanes després d'una lesió en el nervi ciàtic, els animals controls sobreexpressen molts més gens relacionats amb el dolor neuropàtic que els diabètics (Tg-STZ), i això podria estar relacionat amb la pèrdua de la sensibilitat al dolor que s'observa en els pacients amb PND.
- 6) La sobreexpressió de gens com Rgs18 (relacionat amb proliferació i diferenciació), Car3 (possible diana terapèutica per la retinopatia diabètica) i Neto1 (participa en la plasticitat sinàptica), descrits per primer cop en els GAD en condicions de DM, podrien servir per aprofundir en l'estudi de la patogènia de la PND i com a possibles dianes terapèutiques.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

-A-

Abe S, Cavalli V. Nerve injury signalling (2008). *Curr Opin Neurobiol* 18: 276-283

Antunes Bras JM, Laporte AM, Benoliel JJ, Bourgoïn S, Mauborgne A, Hamon M, Cesselin F, Pohl M (1999). Effects of peripheral axotomy on cholecystikinin neurotransmission in the rat spinal cord. *J Neurochem* 72(2):858-867.

Aige V (2001). *Neuroanatomía y neurología clínica en el perro y el gato*. Servei de publicacions, UAB

Apfel SC (1999). Neurotrophic factors and diabetic peripheral neuropathy. *Eur Neurol* 41:27-34

Apfel SC (2006). Diabetic neuropathy models: Are they relevant? *Drug Discov Today Dis Models* 3:397-402

Ara J, Bannerman P, Hahn A, Ramirez S, Pleasure D (2004). Modulation of sciatic nerve expression of class 3 semaphorins by nerve injury. *Neurochem Res* 29(6):1153-1159

Atkinson MA, Leiter EH (1999). The NOD mouse model of type 1 diabetes: as good as it gets? *Nat Med* 5(6):601-604

Avellino AM, Hart D, Dailey AT, MacKinnon M, Ellegala D, Kliot M (1995). Differential macrophage responses in the peripheral and central nervous system during wallerian degeneration of axons. *Exp Neurol* 136: 183-198

-B-

Benjamini Y, Hochberg Y (1995). Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J R Statist Soc* 57: 289-300

Bernard F, Moreau-Fauvarque C, Heitz-Marchaland C, Zagar Y, Dumas L, Fouquet S, Lee X, Shao Z, Mi S, Chédotal A (2012). Role of transmembrane semaphorin Sema6A in oligodendrocyte differentiation and myelination. *Glia* 60(10):1590-1604

Birrell AM, Heffernan SJ, Ansselin AD, McLennan S, Church DK, Gillin AG, Yue DK (2000). Functional and structural abnormalities in the nerves of type I diabetic baboons: aminoguanidine treatment does not improve nerve function. *Diabetologia* 43(1):110-116

Bjartmar L, Huberman AD, Ullian EM, Rentería RC, Liu X, Xu W, Prezioso J, Susman MW, Stellwagen D, Stokes CC, Cho R, Worley P, Malenka RC, Ball S, Peachey NS, Copenhagen D, Chapman B, Nakamoto M, Barres BA, Perin MS (2006). Neuronal pentraxins mediate synaptic refinement in the developing visual system. *J Neurosci* 26(23):6269-6281

Boeshore KL, Schreiber RC, Vaccariello SA, Sachs HH, Salazar R, Lee J, Ratan RR, Leahy P, Zigmond RE (2005). Novel changes in gene expression following axotomy of a sympathetic ganglion: a microarray analysis. *J Neurobiol* 59(2):216-235

Bonilla IE, Tanabe K, Strittmatter SM (2002). Small proline-rich repeat protein 1A is expressed by axotomized neurons and promotes axonal outgrowth. *J Neurosci* 22: 1303-1315

Boulton AJ, Vinik AI, Arezzo JC, Bril V, Feldman EL, Freeman R, Malik RA, Maser RE, Sosenko JM, Ziegler D; American Diabetes Association (2005). Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 28(4):956-962

Bour-Jordan H, Thompson HL, Bluestone JA (2005). Distinct effector mechanisms in the development of autoimmune neuropathy versus diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 175(9):5649-5655

Bradley JL, Thomas PK, King RH, Muddle JR, Ward JD, Tesfaye S, Boulton AJ, Tsigos C, Young RJ (1995). Myelinated nerve fibre regeneration in diabetic sensory polyneuropathy: correlation with type of diabetes. *Acta Neuropathol* 90(4):403-410

Bradley JL, King RH, Muddle JR, Thomas PK (2000). The extracellular matrix of peripheral nerve in diabetic polyneuropathy. *Acta Neuropathol* 99(5):539-546

Brük W (1997). The role of macrophages in peripheral nerve degeneration. *Brain Pathol* 1:741-752

Brussee V, Guo G, Dong Y, Cheng C, Martinez JA, Smith D, Glazner GW, Fernyhough P, Zochodne DW (2008). Distal degenerative sensory neuropathy in a long-term type 2 diabetes rat model. *Diabetes* 57(6):1664-1673

Burnand RC, Price SA, McElhaney M, Barker D, Tomlinson DR (2004). Expression of axotomy-inducible and apoptosis-related genes in sensory nerves of rats with experimental diabetes. *Brain Res Mol Brain Res* 132(2):235-240

-C-

Campbell WW (2008). Evaluation and management of peripheral nerve injury. *Clin Neurophysiol* 119(9):1951-1965

Cao XH, Byun HS, Chen SR, Cai YQ, Pan HL (2010). Reduction in voltage-gated K⁺ channel activity in primary sensory neurons in painful diabetic neuropathy: role of brain-derived neurotrophic factor. *J Neurochem* 114(5):1460-1475

Caroni P, Grandes P (1990). Nerve sprouting in innervated adult skeletal muscle induced by exposure to elevated levels of insulin-like growth factors. *J Cell Biol* 110(4):1307-1317

Carozzi VA, Canta A, Oggioni N, Sala B, Chiorazzi A, Meregalli C, Bossi M, Marmiroli P, Cavaletti G (2010). Neurophysiological and neuropathological characterization of new murine models of chemotherapy-induced chronic peripheral neuropathies. *Exp Neurol* 226(2):301-309

Casellas A, Salavert A, Agudo J, Ayuso E, Jimenez V, Moya M, Muñoz S, Franckhauser S, Bosch F (2006). Expression of IGF-I in pancreatic islets prevents lymphocytic infiltration and protects mice from type 1 diabetes. *Diabetes* 55(12):3246-3255.

Catacuzzeno L, Fioretti B, Pietrobon D, Franciolini F (2008). The differential expression of low-threshold K⁺ currents generates distinct firing patterns in different subtypes of adult mouse trigeminal ganglion neurones. *J Physiol* 586(Pt 21):5101-5118

Chen YS, Chung SS, Chung SK (2010). Aldose reductase deficiency improves Wallerian degeneration and nerve regeneration in diabetic thy1-YFP mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 69(3):294-305

Cheng A, Wang S, Cai J, Rao MS, Mattson MP (2003). Nitric oxide acts in a positive feedback loop with BDNF to regulate neural progenitor cell proliferation and differentiation in the mammalian brain. *Dev Biol* 258(2):319-333

Cheng HL, Russell JW, Feldman EL (1999). IGF-I promotes peripheral nervous system myelination. *Ann N Y Acad Sci* 883:124-130

Chiang SH, Hou JC, Hwang J, Pessin JE, Saltiel AR (2002). Cloning and functional characterization of related TC10 isoforms, a subfamily of Rho proteins involved in insulin-stimulated glucose transport. *J Biol Chem* 277:13067-13073

Cho H, Shin J, Shin CY, Lee SY, Oh U (2002). Mechanosensitive ion channels in cultured sensory neurons of neonatal rats. *Neurosci* 22(4):1238-1247

Cooper JD, Walker NM, Smyth DJ, Downes K, Healy BC, Todd JA; Type I Diabetes Genetics Consortium (2009). Follow-up of 1715 SNPs from the Wellcome Trust Case Control Consortium genome-wide association study in type I diabetes families. *Genes Immun* 10 Suppl 1:S85-94

Coppey LJ, Gellett JS, Davidson EP, Dunlap JA, Yorek MA (2002). Changes in endoneurial blood flow, motor nerve conduction velocity and vascular relaxation of epineurial arterioles of the sciatic nerve in ZDF-obese diabetic rats. *Diabetes Metab Res* 18(1):49-56

Costigan M, Befort K, Karchewski L, Griffin RS, D'Urso D, Allchorne A, Sitarski J, Mannion JW, Pratt RE, Woolf CJ (2002). Replicate high-density rat genome oligonucleotide microarrays reveal hundreds of regulated genes in the dorsal root ganglion after peripheral nerve injury. *BMC Neurosci* 3: 16

Court FA, Wrabetz L, Feltri ML (2006). Basal lamina: Schwann cells wrap to the rhythm of space-time. *Curr Opin Neurobiol* 16(5):501-507

Courtney E, Kornfeld S, Janitz K, Janitz M (2010). Transcriptome profiling in neurodegenerative disease. *J Neurosci Methods* 193(2):189-202

-D-

D'Antoni S, Berretta A, Bonaccorso CM, Bruno V, Aronica E, Nicoletti F, Catania MV (2008). Metabotropic glutamate receptors in glial cells. *Neurochem Res* 33(12):2436-2443

DeFronzo RA (2004). Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med Clin North Am* 88(4):787-835

DeFronzo, E. Ferrannini, H. Keen and P. Zimmet (2004). *International Textbook of Diabetes Mellitus*, 3rd Edition. R.A. John Wiley & Sons, Ltd.

DeLahunta A (1983) *Veterinary Neuroanatomy and Clinical neurology*. 2nd Edition. WB Saunders Co.

Dennis G Jr, Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC, Lempicki RA (2003). DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol.* 4: P3

Dent EW, Tang F, Kalil K (2003). Axon guidance by growth cones and branches: common cytoskeletal and signaling mechanisms. *Neuroscientist* 9(5):343-353

Deshpande AD, Harris-Hayes M, Schootman M (2008). Epidemiology of diabetes and diabetes-related complications. *Phys Ther* 88(11):1254-1264

Devedjian JC, George M, Casellas A, Pujol A, Visa J, Pelegrín M, Gros L, Bosch F (2000). Transgenic mice overexpressing insulin-like growth factor-II in beta cells develop type 2 diabetes. *J Clin Invest* 105(6):731-740

Domènech A, Pasquinelli G, De Giorgio R, Gori A, Bosch F, Pumarola M, Jiménez M (2011). Morphofunctional changes underlying intestinal dysmotility in diabetic RIP-I/hIFN β transgenic mice. *Int J Exp Pathol* 92(6):400-412

Dotta F, Censini S, van Halteren AG, Marselli L, Masini M, Dionisi S, Mosca F, Boggi U, Muda AO, Del Prato S, Elliott JF, Covacci A, Rappuoli R, Roep BO, Marchetti P (2007). Coxsackie B4 virus infection of beta

cells and natural killer cell insulinitis in recent-onset type 1 diabetic patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(12):5115-5120

Drel VR, Mashtalir N, Ilnytska O, Shin J, Li F, Lyzogubov VV, Obrosova IG (2006). The leptin-deficient (ob/ob) mouse: a new animal model of peripheral neuropathy of type 2 diabetes and obesity. *Diabetes* 55(12):3335-3343

Dryden S, Pickavance L, Frankish HM, Williams G (1995). Increased neuropeptide Y secretion in the hypothalamic paraventricular nucleus of obese (fa/fa) Zucker rats. *Brain Res* 690(2):185-188

Dudoit S, Gentleman RC, Quackenbush J (2003). Open source software for the analysis of microarray data. *Biotechniques Suppl*:45-51

Duran-Jimenez B, Dobler D, Moffatt S, Rabbani N, Streuli CH, Thornalley PJ, Tomlinson DR, Gardiner NJ (2009). Advanced glycation end products in extracellular matrix proteins contribute to the failure of sensory nerve regeneration in diabetes. *Diabetes* 58(12):2893-2903

Dyce KM, Sack WO, Wensing CJG (1999). *Anatomía Veterinaria*. 2ª Edición. McGraw-Hill Interamericana.

-E-

Edwards JL, Quattrini A, Lentz SI, Figueroa-Romero C, Cerri F, Backus C, Hong Y, Feldman EL (2010). Diabetes regulates mitochondrial biogenesis and fission in mouse neurons. *Diabetologia* 53(1):160-169

Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci* 95: 14863-14868

Estrella JS, Nelson RN, Sturges BK, Vernau KM, Williams DC, LeCouteur RA, Shelton GD, Mizisin AP (2008). Endoneurial microvascular pathology in feline diabetic neuropathy. *Microvasc Res* 75(3):403-410

Ernfors P, Van De Water T, Loring J, Jaenisch R (1995). Complementary roles of BDNF and NT-3 in vestibular and auditory development. *Neuron* 14(6):1153-1164

Ernsberger U (2009). Role of neurotrophin signalling in the differentiation of neurons from dorsal root ganglia and sympathetic ganglia. *Cell Tissue Res* 336(3):349-384

-F-

Font de Mora J, Esteban LM, Burks DJ, Núñez A, Garcés C, García-Barrado MJ, Iglesias-Osma MC, Moratinos J, Ward JM, Santos E (2003). Ras-GRF1 signaling is required for normal beta-cell development and glucose homeostasis. *EMBO J* 22(12):3039-3049

Forbes JM, Cooper ME (2013). Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev* 93(1):137-188

Fowler MJ (2008). Microvascular and macrovascular complications of diabetes. *Clin Diabetes* 26:77-81

Frostick SP, Yin Q, Kemp GJ (1998). Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration. *Microsurgery* 18(7):397-405

Fudge NJ, Mearow KM (2013). Extracellular matrix-associated gene expression in adult sensory neuron populations cultured on a laminin substrate. *BMC Neurosci* 14:15

-G-

Gabig M, Wegrzyn G (2001). An introduction to DNA chips: principles, technology, applications and analysis. *Acta Biochim Pol* 48(3):615-622

Galer BS, Gianas A, Jensen MP (2000). Painful diabetic polyneuropathy: epidemiology, pain description, and quality of life. *Diabetes Res Clin Pract* 47:123-128

Gentleman R, Carey V, Huber W, Irizarry R, Dudoit S (2005). *Bioinformatics and computational biology solutions using R and Bioconductor*. Springer.

George R, Griffin JW (1994). Delayed macrophage responses and myelin clearance during Wallerian degeneration in the central nervous system: the dorsal radiculotomy model. *Exp Neurol* 129(2):225-36

George M, Ayuso E, Casellas A, Costa C, Devedjian JC, Bosch F (2002). Beta cell expression of IGF-I leads to recovery from type 1 diabetes. *J Clin Invest* 109(9):1153-1163

Geschwind DH (2003). DNA microarrays: translation of the genome from laboratory to clinic. *Lancet Neurol* 2(5):275-282

Gibran NS, Jang YC, Isik FF, Greenhalgh DG, Muffley LA, Underwood RA, Usui ML, Larsen J, Smith DG, Bunnett N, Ansel JC, Olerud JE (2002). Diminished neuropeptide levels contribute to the impaired cutaneous healing response associated with diabetes mellitus. *J Surg Res* 108(1):122-128.

Gantus MA, Nasciutti LE, Cruz CM, Persechini PM, Martinez AM (2006). Modulation of extracellular matrix components by metalloproteinases and their tissue inhibitors during degeneration and regeneration of rat sural nerve. *Brain Res* 1122(1):36-46

Gómez-Gonzalo M, Losi G, Chiavegato A, Zonta M, Cammarota M, Brondi M, Vetri F, Uva L, Pozzan T, de Curtis M, Ratto GM, Carmignoto G (2010). An excitatory loop with astrocytes contributes to drive neurons to seizure threshold. *Plos Biol* 8(4):e1000352

Gorski JA, Zeiler SR, Tamowski S, Jones KR (2003). Brain-derived neurotrophic factor is required for the maintenance of cortical dendrites. *J Neurosci* 23(17):6856-6865

Gross V, Tank J, Partke HJ, Plehm R, Diedrich A, da Costa Goncalves AC, Luft FC, Jordan J (2008). Cardiovascular autonomic regulation in Non-Obese Diabetic (NOD) mice. *Auton Neurosci* 138(1-2):108-113

Gumy LF, Bampton ET, Tolkovsky AM (2008). Hyperglycaemia inhibits Schwann cell proliferation and migration and restricts regeneration of axons and Schwann cells from adult murine DRG. *Mol Cell Neurosci* 37(2):298-311

-H-

Hahm S, Mizuno TM, Wu TJ, Wisor JP, Priest CA, Kozak CA, Boozer CN, Peng B, McEvoy RC, Good P, Kelley KA, Takahashi JS, Pintar JE, Roberts JL, Mobbs CV, Salton SR (1999). Targeted deletion of the Vgf gene indicates that the encoded secretory peptide precursor plays a novel role in the regulation of energy balance. *Neuron* 23(3):537-548

Hahm S, Fekete C, Mizuno TM, Windsor J, Yan H, Boozer CN, Lee C, Elmquist JK, Lechan RM, Mobbs CV, Salton SR (2002). VGF is required for obesity induced by diet, gold thioglucose treatment, and agouti and is differentially regulated in pro-opiomelanocortin- and neuropeptide Y-containing arcuate neurons in response to fasting. *J Neurosci* 22(16):6929-6938

Hall S. The response to injury in the peripheral nervous system (2005). *J Bone Joint Surg Br.* 87(10): 1309-1319

Hanstein R, Trotter J, Behl C, Clement AB (2009). Increased connexin 43 expression as a potential mediator of the neuroprotective activity of the corticotropin-releasing hormone. *Mol Endocrinol* 23:1479-1493

Hanz S, Fainzilber M (2006). Retrograde signaling in injured nerve--the axon reaction revisited. *J Neurochem* 99:13-19

Hari A, Djohar B, Skutella T, Montazeri S (2004). Neurotrophins and extracellular matrix molecules modulate sensory axon outgrowth. *Int J Dev Neurosci* 22(2):113-117

Hattangady NG, Rajadhyaksha MS (2009). A brief review of in vitro models of diabetic neuropathy. *Int J Diabetes Dev Ctries* 29(4):143-149

Hellard D, Brosenitsch T, Fritzsich B, Katz DM (2004). Cranial sensory neuron development in the absence of brain-derived neurotrophic factor in BDNF/Bax double null mice. *Dev Biol* 275(1):34-43

Hill R (2009). Extracellular matrix remodelling in human diabetic neuropathy. *J Anat* 214(2):219-225

Hoffman PN (2010). A conditioning lesion induces changes in gene expression and axonal transport that enhance regeneration by increasing the intrinsic growth state axons. *Exp Neurol* 223:11-18

Hökfelt T, Stanic D, Sanford SD, Gatlin JC, Nilsson I, Paratcha G, Ledda F, Fetissov S, Lindfors C, Herzog H, Johansen JE, Ubink R, Pfenninger KH (2008). NPY and its involvement in axon guidance, neurogenesis, and feeding. *Nutrition* 24: 860-868

Holmes FE, Mahoney S, King VR, Bacon A, Kerr NC, Pachnis V, Curtis R, Priestley JV, Wynick D (2000). Targeted disruption of the galanin gene reduces the number of sensory neurons and their regenerative capacity. *Proc Natl Acad Sci* 97:11563-11568

Homs J, Ariza L, Pagès G, Verdú E, Casals L, Udina E, Chillón M, Bosch A, Navarro X (2011). Comparative study of peripheral neuropathy and nerve regeneration in NOD and ICR diabetic mice. *J Peripher Nerv Syst* 16: 213-227

Huang HY, Chang HY, Chou CH, Tseng CP, Ho SY, Yang CD, Ju YW, Huang HD (2009). sRNAMap: genomic maps for small non-coding RNAs, their regulators and their targets in microbial genomes. *Nucleic Acids Res* 37(Database issue):D150-154

Huijberts MS, Schaper NC, Schalkwijk CG (2008). Advanced glycation end products and diabetic foot disease. *Diabetes Metab Res Rev Suppl* 1:S19-24

-I-

Ide C, Tohyama K, Yokota R, Nitatori T, Onodera S (1983). Schwann cell basal lamina and nerve regeneration. *Brain Res* 288(1-2):61-75

Inoue H, Lin L, Lee X, Shao Z, Mendes S, Snodgrass-Belt P, Sweigard H, Engber T, Pepinsky B, Yang L, Beal MF, Mi S, Isacson O (2007). Inhibition of the leucine-rich repeat protein LINGO-1 enhances survival, structure, and function of dopaminergic neurons in Parkinson's disease models. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(36):14430-14435

International Diabetes Federation (2011). *IDF diabetes atlas, Fifth edition. Health expenditure for Diabetes, 2012 Update.*

Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP (2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 4: 249-264

-J-

Jankowski MP, Cornuet PK, McIlwrath S, Koerber HR, Albers KM (2006). SRY-box containing gene 11 (Sox11) transcription factor is required for neuron survival and neurite growth. *Neuroscience* 143: 501-514

Jankowski MP, McIlwrath SL, Jing X, Cornuet PK, Salerno KM, Koerber HR, Albers KM (2009). Sox11 transcription factor modulates peripheral nerve regeneration in adult mice. *Brain Res* 1256:43-54

Jensen HS, Callø K, Jespersen T, Jensen BS, Olesen SP (2005). The KCNQ5 potassium channel from mouse: a broadly expressed M-current like potassium channel modulated by zinc, pH, and volume changes. *Brain Res Mol Brain Res* 139(1):52-62

Jiang F, Frederick TJ, Wood TL (2001). IGF-I synergizes with FGF-2 to stimulate oligodendrocyte progenitor entry into the cell cycle. *Dev Biol* 232(2):414-423

Jing X, Wang T, Huang S, Glorioso JC, Albers KM (2012). The transcription factor Sox11 promotes nerve regeneration through activation of the regeneration-associated gene *Sprr1a*. *Exp Neurol* 233:221-232

-K-

Kamboj SS, Vasishta RK, Sandhir R (2010). N-acetylcysteine inhibits hyperglycemia-induced oxidative stress and apoptosis markers in diabetic neuropathy. *J Neurochem* 112(1):77-91

Kamijo M, Merry AC, Akdas G, Cherian PV, Sima AA (1996). Nerve fiber regeneration following axotomy in the diabetic biobreeding Worcester rat: the effect of ARI treatment. *J Diabetes Complications* 10(4):183-191

Kamiya H, Zhangm W, Sima AA (2005). Apoptotic stress is counterbalanced by survival elements preventing programmed cell death of dorsal root ganglions in subacute type 1 diabetic BB/Wor rats. *Diabetes* 54(11):3288-3295

Kanatani A, Mashiko S, Murai N, Sugimoto N, Ito J, Fukuroda T, Fukami T, Morin N, MacNeil DJ, Van der Ploeg LH, Saga Y, Nishimura S, Ihara M (2000). Role of the Y1 receptor in the regulation of neuropeptide Y-mediated feeding: comparison of wild-type, Y1 receptor-deficient, and Y5 receptor-deficient mice. *Endocrinology* 141(3):1011-1016

Karamoysoyli E, Burnand RC, Tomlinson DR, Gardiner NJ (2008). Neuritin mediates nerve growth factor-induced axonal regeneration and is deficient in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes* 57(1):181-189

Kataoka K, Kanje M, Dahlin LB (2007). Induction of activating transcription factor 3 after different sciatic nerve injuries in adult rats. *Scand J Plast Reconstr Surg hand Surg* 41: 158-166

Katsanos GS, Anogianaki A, Castellani ML, Ciampoli C, De Amicis D, Orso C, Pollice R, Vecchiet J, Tetè S, Salini V, Caraffa A, Patruno A, Shaik YB, Kempuraj D, Doyle R, Antinolfi PL, Cerulli G, Conti CM, Fulcheri M, Neri G, Sabatino G (2008). Biology of neurotensin: revisited study. *Int J Immunopathol Pharmacol* 21: 255-259

- Kennedy JM, Zochodne DW (2000). The regenerative deficit of peripheral nerves in experimental diabetes: its extent, timing and possible mechanisms. *Brain* 10:2118-2129
- Kennedy JM, Zochodne DW (2005). Impaired peripheral nerve regeneration in diabetes mellitus. *J Peripher Nerv Syst* 10(2):144-157
- Kerekes N, Landry M, Lundmark K, Hökfelt T (2000). Effect of NGF, BDNF, bFGF, aFGF and cell density on NPY expression in cultured rat dorsal root ganglion neurones. *J Auton Nerv Syst* 81(1-3):128-138
- Kerschensteiner M, Schwab ME, Lichtman JW, Missfeldt T (2005). In vivo imaging of axonal degeneration and regeneration in the injured spinal cord. *Nat Med* 11(5):572-577
- Kierszenbaum AL, Tres LL (2012). *Histology and cell biology: an introduction to pathology*. 3rd Edition. Elsevier Saunders.
- Kim DS, Choi JO, Rim HD, Cho HJ (2002). Downregulation of voltage-gated potassium channel alpha gene expression in dorsal root ganglia following chronic constriction injury of the rat sciatic nerve. *Brain Res Mol Brain Res* 105(1-2):146-152
- Kim YH, Lee H, Kim TY, Hwang HR, Lee SC (2009). Differential expression of prohibitin and regulation of apoptosis in wild-type and COX-2 null mouse embryonic fibroblasts. *J Dermatol Sci* 53: 157-159
- Kogawa S, Yasuda H, Terada M, Maeda K, Kikkawa R (2000). Apoptosis and impaired axonal regeneration of sensory neurons after nerve crush in diabetic rats. *Neuroreport* 11(4):663-667
- Kostić S, Puljak L, Sapunar D (2013). Attenuation of pain-related behaviour evoked by carrageenan injection through blockade of neuropeptide Y Y1 and Y2 receptors. *Eur J Pain* 17(4):493-504
- Kuhlbrodt K, Herbarth B, Sock E, Enderich J, Hermans-Borgmeyer I, Wegner M (1998). Cooperative function of POU proteins and SOX proteins in glial cells. *J Biol Chem* 273: 16050-16057
- Kume E, Fujimura H, Matsuki N, Ito M, Aruga C, Toriumi W, Kitamura K, Doi K (2004). Hepatic changes in the acute phase of streptozotocin (SZ)-induced diabetes in mice. *Exp Toxicol Pathol*. 55(6):467-480
- Kume E, Aruga C, Ishizuka Y, Takahashi K, Miwa S, Itoh M, Fujimura H, Toriumi W, Kitamura K, Doi K (2005). Gene expression profiling in streptozotocin treated mouse liver using DNA microarray. *Exp Toxicol Pathol* 56(4-5):235-244
- Kuroda H, Sobhan U, Sato M, Tsumura M, Ichinohe T, Tazaki M, Shibukawa Y (2013). Sodium-calcium exchangers in rat trigeminal ganglion neurons. *Mol Pain* 9:22

-L-

Lattimer SA, Sima AA, Greene DA (1989). In vitro correction of impaired Na⁺-K⁺-ATPase in diabetic nerve by protein kinase C agonists. *Am J Physiol* 256(2 Pt 1):E264-9

LeDoux MS, Xu L, Xiao J, Ferrell B, Menkes DL, Homayouni R (2006). Murine central and peripheral nervous system transcriptomes: comparative gene expression. *Brain Res* 1107(1):24-41

Lenninger GM, Vincent AM, Feldman EL (2004). The role of growth factors in diabetic peripheral neuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 9:26-53

Lenninger GM, Backus C, Sastry AM, Yi YB, Wang CW, Feldman EL (2006). Mitochondria in DRG neurons undergo hyperglycemic mediated injury through Bim, Bax and the fission protein Drp1. *Neurobiol Dis* 23(1):11-22

Lenzen S (2008). The mechanisms of alloxan and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 51(2):216-226

Li F, Abatan OI, Kim H, Burnett D, Larkin D, Obrosova IG, Stevens MJ (2006). Taurine reverses neurological and neurovascular deficits in Zucker diabetic fatty rats. *Neurobiol Dis* 22(3):669-676

Li Z, Su Z, Wen Z, Shi L, Chen T (2009). Microarray platform consistency is revealed by biologically functional analysis of gene expression profiles. *BMC Bioinformatics* 10 Suppl 11:S12

Lieberam I, Agalliu D, Nagasawa T, Ericson J, Jessell TM (2005). A Cxcl12-CXCR4 chemokine signaling pathway defines the initial trajectory of mammalian motor axons. *Neuron* 47(5):667-679

Lin L, Lee VM, Wang Y, Lin JS, Sock E, Wegner M, Lei L (2011). Sox11 regulates survival and axonal growth of embryonic sensory neurons. *Dev Dyn* 240(1):52-64

Lukic IK, Humpert PM, Nawroth PP, Bierhaus A (2008). The RAGE pathway: activation and perpetuation in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Ann N Y Acad Sci* 1126:76-80

Lv J, Xu RX, Jiang XD, Lu X, Ke YQ, Cai YQ, Du MX, Hu C, Zou YX, Qin LS, Zeng YJ (2010). Passive immunization with LINGO-1 polyclonal antiserum afforded neuroprotection and promoted functional recovery in a rat model of spinal cord injury. *Neuroimmunomodulation* 17(4):270-278

-M-

Madduri S, Gander B (2012). Growth factor delivery systems and repair strategies for damaged peripheral nerves. *J Control Release* 161(2):274-282

Mahoney SA, Hosking R, Farrant S, Holmes FE, Jacoby AS, Shine J, Iismaa TP, Scott MK, Schmidt R, Wynick D (2003). The second galanin receptor GalR2 plays a key role in neurite outgrowth from adult sensory neurons. *J Neurosci* 23:416-421

Maison SF, Rosahl TW, Homanics GE, Liberman MC (2006). Functional role of GABAergic innervation of the cochlea: phenotypic analysis of mice lacking GABA(A) receptor subunits alpha 1, alpha 2, alpha 5, alpha 6, beta 2, beta 3, or delta. *J Neurosci* 26(40):10315-10326.

Makwana M, Raivich G (2005). Molecular mechanisms in successful peripheral regeneration. *FEBS J* 272: 2628-2638

Marondel I, Renault B, Lieman J, Ward D, Kucherlapati R (1996). Physical mapping of the human neurotensin gene (NTS) between markers D12S1444 and D12S81 on chromosome 12q21. *Genomics* 38: 243-245

Maughan NJ, Lewis FA, Smith V (2001). An introduction to arrays. *J Pathol* 195(1):3-6

Meyer G, Cabrera Socorro A, Perez Garcia CG, Martinez Millan L, Walker N, Caput D (2004). Developmental roles of p73 in Cajal-Retzius cells and cortical patterning. *J Neurosci* 24(44):9878-9887

Mi S, Miller RH, Lee X, Scott ML, Shulag-Morskaya S, Shao Z, Chang J, Thill G, Levesque M, Zhang M, Hession C, Sah D, Trapp B, He Z, Jung V, McCoy JM, Pepinsky RB (2005). LINGO-1 negatively regulates myelination by oligodendrocytes. *Nat Neurosci* 8(6):745-751

Mizisin AP, Bache M, Distefano PS, Acheson A, Lindsay RM, Calcutt NA (1997). BDNF attenuates functional and structural disorders in nerves of galactose-fed rats. *J Neuropathol Exp Neurol* 56(12):1290-1301

Mizisin AP, Shelton GD, Burgers ML, Powell HC, Cuddon PA (2002). Neurological complications associated with spontaneously occurring feline diabetes mellitus. *J Neuropathol Exp Neurol* 61(10):872-884.

Mizisin AP, Nelson RW, Sturges BK, Vernau KM, Lecouteur RA, Williams DC, Burgers ML, Shelton GD (2007). Comparable myelinated nerve pathology in feline and human diabetes mellitus. *Acta Neuropathol* 113(4):431-442

Molín J. Functional, morphological and immunohistochemical studies of the peripheral nervous system in the diabetic RIP-1/hINF β transgenic mouse model and additional studies of diabetic neuropathy in other diabetic murine models. Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona; 2011

Molyneaux KA, Zinszner H, Kunwar PS, Schaible K, Stebler J, Sunshine MJ, O'Brien W, Raz E, Littman D, Wylie C, Lehmann R (2003). The chemokine SDF1/CXCL12 and its receptor CXCR4 regulate mouse germ cell migration and survival. *Development* 130(18):4279-4286

Morrione A, Romano G, Navarro M, Reiss K, Valentinis B, Dews M, Eves E, Rosner MR, Baserga R (2000). Insulin-like growth factor I receptor signaling in differentiation of neuronal H19-7 cells. *Cancer Res* 60(8):2263-2272

-N-

Nagata K, Kiryu-Seo S, Maeda M, Yoshida K, Morita T, Kiyama H (2010). Damage-induced neuronal endopeptidase is critical for presynaptic formation of neuromuscular junctions. *J Neurosci* 30: 6954-6962

Navarro X, Vivó M, Valero-Cabré A (2007). Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Prog Neurobiol* 82: 163-201

Nehrt A, Rodgers R, Shapiro S, Borgens R, Shi R (2007). The critical role of voltage-dependent calcium channel in axonal repair following mechanical trauma. *Neuroscience* 146: 1504-1512

Ng D, Pitcher GM, Szilard RK, Sertié A, Kanisek M, Clapcote SJ, Lipina T, Kalia LV, Joo D, McKerlie C, Cortez M, Roder JC, Salter MW, McInnes RR (2009). Neto1 is a novel CUB-domain NMDA receptor-interacting protein required for synaptic plasticity and learning. *PLoS Biol* 7(2):e41

Nilsson A, Moller K, Dahlin L, Lundborg G, Kanje M (2005). Early changes in gene expression in the dorsal root ganglia after transection of the sciatic nerve; effects of amphiregulin and PAI-1 on regeneration. *Brain Res Mol Brain Res* 136(1-2):65-74

-O-

Obrosova IG, Li F, Abatan OI, Forsell MA, Komjáti K, Pacher P, Szabó C, Stevens MJ (2004). Role of poly(ADP-ribose) polymerase activation in diabetic neuropathy. *Diabetes* 53(3):711-720

Obrosova IG, Pacher P, Szabó C, Zsengeller Z, Hirooka H, Stevens MJ, Yorek MA (2005). Aldose reductase inhibition counteracts oxidative-nitrosative stress and poly(ADP-ribose) polymerase activation in tissue sites for diabetes complications. *Diabetes* 54(1):234-242

Obrosova IG (2008). Diabetes and the peripheral nerve. *Biochim Biophys Acta* 1792:931-940

Oka M, Kato N (2001). Aldose reductase inhibitors. *J Enzyme Inhib* 16(6):465-473

Oztürk G, Sekeroğlu MR, Erdoğan E, Oztürk M (2006). The effect of non-enzymatic glycation of extracellular matrix proteins on axonal regeneration in vitro. *Acta Neuropathol* 112(5):627-632

-P-

Pabbidi RM, Cao DS, Parihar A, Pauza ME, Premkumar LS (2008). Direct role of streptozotocin in inducing thermal hyperalgesia by enhanced expression of transient receptor potential vanilloid 1 in sensory neurons. *Mol Pharmacol* 73(3):995-1004

Pacher P, Szabó C (2005). Role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation in the pathogenesis of diabetic complications: endothelial dysfunction, as a common underlying theme. *Antioxid Redox Signal* 7(11-12):1568-1580

Pacher P, Obrosova IG, Mabley JG, Szabó C (2005). Role of nitrosative stress and peroxynitrite in the pathogenesis of diabetic complications. Emerging new therapeutical strategies. *Curr Med Chem* 12(3):267-275

Pant HC (1998). Dephosphorylation of neurofilament proteins enhances their susceptibility to degradation by calpain. *Biochem J* 256(2):665-668

Park IK, Klug CA, Li K, Jerabek L, Li L, Nanamori M, Neubig RR, Hood L, Weissman IL, Clarke MF (2001). Molecular cloning and characterization of a novel regulator of G-protein signaling from mouse hematopoietic stem cells. *J Biol Chem* 276(2):915-923

Patel AV, Krimm RF (2010). BDNF is required for the survival of differentiated geniculate ganglion neurons. *Dev Biol* 340(2):419-429

Patodia S, Raivich G (2012). Role of transcription factors in peripheral nerve regeneration. *Front Mol Neurosci* 5(8):1-15

Peltonen JT, Kalliomäki MA, Muona PK (1997). Extracellular matrix of peripheral nerves in diabetes. *J Peripher Nerv Syst* 2(3):213-226

Pelegrin M, Devedjian JC, Costa C, Visa J, Solanes G, Pujol A, Asins G, Valera A, Bosch F (1998). Evidence from transgenic mice that interferon-beta may be involved in the onset of diabetes mellitus. *J Biol Chem* 273(20):12332-12340

Perkins BA, Olaleye D, Bril V (2002). Carpal tunnel syndrome in patients with diabetic polyneuropathy. *Diabetes Care* 25(3):565-569

Perry V, Brown M (1992). Role of macrophages in peripheral nerve degeneration and repair. *Bioessays* 14:401-406

Pffafel MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: 2002-2007

Pittenger G, Vinik A (2003). Nerve growth factor and diabetic neuropathy. *Exp Diabetes Res* 4(4):271-285

Pope RJ, Holmes FE, Kerr NC, Wynick D (2010). Characterization of the nociceptive phenotype of suppressible galanin overexpressing transgenic mice. *Mol Pain* 6:67-72

Potzner MR, Tsarovina K, Binder E, Penzo-Méndez A, Lefebvre V, Rohrer H, Wegner M, Sock E (2010). Sequential requirement of Sox4 and Sox11 during development of the sympathetic nervous system. *Development* 137:775-784

Previtali SC, Malaguti MC, Riva N, Scarlato M, Dacci P, Dina G, Triolo D, Porrello E, Lorenzetti I, Fazio R, Comi G, Bolino A, Quattrini A (2008). The extracellular matrix affects axonal regeneration in peripheral neuropathies. *Neurology* 71(5):322-331

Price SA, Agthong S, Middlemas AB, Tomlinson DR (2004). Mitogen-activated protein kinase p38 mediates reduced nerve conduction velocity in experimental diabetic neuropathy: interactions with aldose reductase. *Diabetes* 53(7):1851-1856

-R-

Ragolia L, Begum N. Protein phosphatase-1 and insulin action (1998). *Mol Cell Biochem* 182(1-2):49-58

Raivich G, Makwana M (2007). The making of successful axonal regeneration: genes, molecules and signal transduction pathways. *Brain Res Rev* 53: 287-311

Rees DA, Alcolado JC (2005). Animal models of diabetes mellitus. *Diabet Med* 22(4):359-370

Reid AJ, Welin D, Wiberg M, Terenghi G, Novikov LN (2010). Peripherin and Atf3 genes are differentially regulated in regenerating and non-regenerating primary sensory neurons. *Brain Res* 1310: 1-7

Rhee SY, Wood V, Dolinski K, Draghici S (2008). Use and misuse of the gene ontology annotations. *Nat Rev Genet* 9: 509-515

Rind HB, von Bartheld CS (2002). Target-derived cardiotrophin-1 and insulin-like growth factor-I promote neurite growth and survival of developing oculomotor neurons. *Mol Cell Neurosci* 19(1):58-71

Rishal I, Fainzilber M (2010). Retrograde signalling in axonal regeneration. *Exp Neurol* 223: 5-10

Robertson DM, Sima AA (1980). Diabetic neuropathy in the mutant mouse [C57BL/ks(db/db)]: a morphometric study. *Diabetes* 29(1):60-67

Rossi F, Gianola S, Corvetto L (2007). Regulation of intrinsic neuronal properties for axon growth and regeneration. *Prog Neurobiol* 81: 1-28

Russell JW, Sullivan KA, Windebank AJ, Herrmann DN, Feldman EL (1999). Neurons undergo apoptosis in animal and cell culture models of diabetes. *Neurobiol Dis* 6(5):347-363.

-S-

Salerno KM, Jing X, Diges CM, Cornuet PK, Glorioso JC, Albers KM (2012). Sox11 modulates brain-derived neurotrophic factor expression in an exon promoter-specific manner. *J Neurosci Res* 90(5):1011-1019

Saito H, Dahlin LB (2008). Expression of Atf3 and axonal outgrowth are impaired after delayed nerve repair. *BMC Neurosci* 9:88

Salavert A. Estudi en animals transgènics del paper de la sobreexpressió d'IFG-II en cèl·lula B en el desenvolupament de diabetis mellitus. Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona, 2008

Sanford SD, Gatlin JC, Hökfelt T, Pfenninger KH (2008). Growth cone responses to growth and chemotropic factors. *Eur J Neurosci* 28(2):268-278

Sango K, Horie H, Inoue S (1999). Administration of an aldose reductase inhibitor, ONO-2235, to streptozotocin-diabetic mice restores reductions of DRG neuronal attachment to extracellular matrix proteins in vitro. *Neurosci Lett* 263(2-3):157-160

Sapunar D, Vukojević K, Kostić S, Puljak L (2011). Attenuation of pain-related behavior evoked by injury through blockade of neuropeptide Y Y2 receptor. *Pain* 152(5):1173-1181

Schulze A, Downward J (2001). Navigating gene expression using microarrays--a technology review. *Nat Cell Biol* 3(8):E190-195

Seiffers R, Allchorne AJ, Woolf CJ (2006). The transcription factor ATF-3 promotes neurite outgrowth. *Mol Cell Neurosci* 32:143-154

Seiffers R, Mills CD, Woolf CJ (2007). ATF3 increases the intrinsic growth state of DRG neurons to enhance peripheral nerve regeneration. *J Neurosci* 27:7911-7920

Serafín A, Molín J, Márquez M, Blasco E, Vidal E, Foradada L, Añor S, Rabanal RM, Fondevila D, Bosch F, Pumarola M (2010). Diabetic neuropathy: electrophysiological and morphological study of peripheral nerve degeneration and regeneration in transgenic mice that express IFNbeta in beta cells. *Muscle Nerve* 41:630-641

Shangguan Y, Hall KE, Neubig RR, Wiley JW (2003). Diabetic neuropathy: inhibitory G protein dysfunction involves PKC-dependent phosphorylation of Galpha. *J Neurochem* 86(4):1006-1014

Sharma AK, Malik RA, Dhar P, Mehra RD, Ahmed I, Lowrie CT, Schall WD (1995). Peripheral nerve abnormalities in spontaneously diabetic dog. *Int J Diabetes* 3:130-139

- Sheward WJ, Lutz EM, Copp AJ, Harmar AJ (1998). Expression of PACAP, and PACAP type 1 (PAC1) receptor mRNA during development of the mouse embryo. *Brain Res Dev Brain Res* 109: 245-253
- Shim S, Ming GL (2010). Roles of channels and receptors in the growth cone during PNS axonal regeneration. *Exp Neurol* 223: 38-44
- Sigaudo-Roussel D, Fromy B, Saumet JL (2007). Diabetic neuropathy in animal models. *Drug Discov Today Dis Models* 4:39-44
- Sima AA, Thomas PK, Ishii D, Vinik A (1997). Diabetic neuropathies. *Diabetologia* 40 Suppl 3:B74-77
- Sima AA (2003). New insights into the metabolic and molecular basis for diabetic neuropathy. *Cell Mol Life Sci* 60(11):2445-2464
- Sima AA, Kamiya H (2006). Diabetic neuropathy differs in type 1 and type 2 diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 1084:235-249
- Sievers C, Platt N, Perry VH, Coleman MP, Conforti L (2003). Neurites undergoing Wallerian degeneration show an apoptotic-like process with Annexin V positive staining and loss of mitochondrial membrane potential. *Neurosci Res* 46(2):161-169
- Sluka KA, Audette KM (2006). Activation of protein kinase C in the spinal cord produces mechanical hyperalgesia by activating glutamate receptors, but does not mediate chronic muscle-induced hyperalgesia. *Mol Pain* 3:2-13
- Smyth GK (2004). Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 3: Article3
- Son SJ, Lee KM, Jeon SM, Park ES, Park KM, Cho HJ (2007). Activation of transcription factor c-jun in dorsal root ganglia includes VIP and NPY upregulation and contributes to the pathogenesis of neuropathic pain. *Exp Neurol* 204: 467-472
- Southern E, Mir K, Shchepinov M (1999). Molecular interactions on microarrays. *Nat Genet* 21(1 Suppl):5-9
- Srinivasan S, Stevens M, Wiley JW (2000). Diabetic peripheral neuropathy: evidence for apoptosis and associated mitochondrial dysfunction. *Diabetes* 49(11):1932-1938
- Srinivasan K, Ramarao P (2007). Animal models in type 2 diabetes research: an overview. *Indian J Med Res* 125(3):451-472
- Staecker H, Van De Water TR, Lefebvre PP, Liu W, Moghadassi M, Galinovic-Schwartz V, Malgrange B, Moonen G (1996). NGF, BDNF and NT-3 play unique roles in the in vitro development and patterning of innervation of the mammalian inner ear. *Brain Res Dev Brain Res* 92(1):49-60

Starkey ML, Davies M, Yip PK, Carter LM, Wong DJ, McMahon SB, Bradbury EJ (2009). Expression of the regeneration-associated protein SPRR1A in primary sensory neurons and spinal cord of the adult mouse following peripheral and central injury. *J Comp Neurol* 513: 51-68

Stefaneanu L, Powell-Braxton L, Won W, Chandrashekar V, Bartke A (1999). Somatotroph and lactotroph changes in the adenohypophyses of mice with disrupted insulin-like growth factor I gene. *Endocrinology* 140(9):3881-3889

Stenberg L, Kanje M, Dolezal K, Dahlin LB (2012). Expression of activating transcription factor 3 (ATF 3) and caspase 3 in Schwann cells and axonal outgrowth after sciatic nerve repair in diabetic BB rats. *Neurosci Lett* 515(1):34-38

Sugden MC, Holness MJ (2002). Therapeutic potential of the mammalian pyruvate dehydrogenase kinases in the prevention of hyperglycaemia. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2(2):151-165

Sugimoto K, Kasahara T, Yonezawa H, Yagihashi S (1999). Peripheral nerve structure and function in long-term galactosemic dogs: morphometric and electron microscopic analyses. *Acta Neuropathol* 97(4):369-376

Sugimoto K, Murakawa Y, Sima AA (2000). Diabetic neuropathy - a continuing enigma. *Diabetes Metab Res Rev* 16(6):408-433

Sugimoto K, Yasujima M, Yagihashi S (2008). Role of advanced glycation end products in diabetic neuropathy. *Curr Pharm Des* 14(10):953-961

Sullivan KA, Hayes JM, Wiggin TD, Backus C, Su Oh S, Lentz SI, Brosius F 3rd, Feldman EL (2007). Mouse models of diabetic neuropathy. *Neurobiol Dis* 28(3):276-285

Suzuki T, Mizuno K, Yashima S, Watanabe K, Taniko K, Yabe-Nishimura C (1999). Characterization of polyol pathway in Schwann cells isolated from adult rat sciatic nerves. *J Neurosci Res* 57(4):495-503

Swanberg M, Duvefelt K, Diez M, Hillert J, Olsson T, Piehl F, Lidman O (2006). Genetically determined susceptibility to neurodegeneration is associated with expression of inflammatory genes. *Neurobiol Dis* 24(1):67-88

Szabó C (2005). Roles of poly(ADP-ribose) polymerase activation in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications. *Pharmacol Res* 52(1):60-71

Szkudelski T (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 50(6):537-546

Szpara ML, Vranizan K, Tai YC, Goodman CS, Speed TP, Ngai J (2007). Analysis of gene expression during neurite outgrowth and regeneration. *BMC Neurosci* 8: 100

-T-

Talmud PJ, Hingorani AD, Cooper JA, Marmot MG, Brunner EJ, Kumari M, Kivimäki M, Humphries SE (2010). Utility of genetic and non-genetic risk factors in prediction of type 2 diabetes: Whitehall II prospective cohort study. *BMJ* 14;340:b4838

Tanabe K, Bonilla I, Winkles JA, Strittmatter SM (2003). Fibroblast growth factor-inducible-14 is induced in axotomized neurons and promotes neurite outgrowth. *J Neurosci* 23: 9675-9686

Terada M, Yasuda H, Kikkawa R, Shigeta Y (1996). Tolrestat improves nerve regeneration after crush injury in streptozocin-induced diabetic rats. *Metabolism* 45(10):1189-1195

Tessarollo L, Coppola V, Fritzch B (2003). NT-3 replacement with brain-derived neurotrophic factor redirects vestibular nerve fibers to the cochlea. *J Neurosci* 24(10):2575-2584

Thomsen NO, Cederlund R, Rosén I, Björk J, Dahlin LB (2009). Clinical outcomes of surgical release among diabetic patients with carpal tunnel syndrome: prospective follow-up with matched controls. *J Hand Surg Am* 34(7):1177-1187

Tomlinson DR, Gardiner NJ (2008). Diabetic neuropathies: components etiology. *J Peripher Nerv Syst* 13:112-121

Toth C, Rong LL, Yang C, Martinez J, Song F, Ramji N, Brussee V, Liu W, Durand J, Nguyen MD, Schmidt AM, Zochodne DW (2008). Receptor for advanced glycation end products (RAGEs) and experimental diabetic neuropathy. *Diabetes* 57(4):1002-1017

Tucker B, Mearow K (2008). Peripheral sensory axon growth: from receptor binding to cellular signalling. *Can J Neurol Sci* 35:551-566

-U-

Uehara K, Yamagishi S, Otsuki S, Chin S, Yagihashi S (2004). Effects of polyol pathway hyperactivity on protein kinase C activity, nociceptive peptide expression, and neuronal structure in dorsal root ganglia in diabetic mice. *Diabetes* 53(12):3239-3247

Underwood RA, Gibran NS, Muffley LA, Usui ML, Olerud JE (2001). Color subtractive-computer-assisted image analysis for quantification of cutaneous nerves in a diabetic mouse model. *J Histochem Cytochem* 49(10):1285-1291

-V-

Valdés-Sánchez T, Kirstein M, Pérez-Villalba A, Vega JA, Fariñas I (2010). BDNF is essentially required for the early postnatal survival of nociceptors. *Dev Biol* 339(2):465-476

Vargas ME, Barres BA (2007). Why is Wallerian degeneration in the CNS so slow? *Annu Rev Neurosci* 30:153-179

Verdú E, Rodríguez FJ, Gudiño-Cabrera G, Nieto-Sampedro M, Navarro X (2000). Expansion of adult Schwann cells from mouse predegenerated peripheral nerves. *J Neurosci Methods* 99(1-2):111-117

Veves A, Backonja M, Malik RA (2008). Painful diabetic neuropathy: Epidemiology, natural history, early diagnosis, and treatment options. *Pain Medicine* 9:660-674

Vicario-Abejón C, Yusta-Boyo MJ, Fernández-Moreno C, de Pablo F (2003). Locally born olfactory bulb stem cells proliferate in response to insulin-related factors and require endogenous insulin-like growth factor-I for differentiation into neurons and glia. *J Neurosci* 23(3):895-906

Vignal E, De Toledo M, Comunale F, Ladopoulou A, Gauthier-Rouvière C, Blangy A, Fort P (2000). Characterization of TCL, a new GTPase of the rho family related to TC10 and Ccdc42. *J Biol Chem* 275:36457-36464

Vincent JP, Mazella J, Kitabgi P (1999). Neurotensin and neurotensin receptors. *Trends Pharmacol Sci* 20:302-309

Vincent AM, Feldman EL (2004). New insights into the mechanisms of diabetic neuropathy. *Rev Endocr Metab Disord* 5(3):227-236

Vincent AM, Perrone L, Sullivan KA, Backus C, Sastry AM, Lastoskie C, Feldman EL (2007). Receptor for advanced glycation end products activation injures primary sensory neurons via oxidative stress. *Endocrinology* 148(2):548-558

Vinik AI, Mehrabyan A (2004). Diabetic neuropathies. *Med Clin North Am* 88(4):947-999

-W-

Wada R, Yagihashi S (2005). Role of advanced glycation end products and their receptors in development of diabetic neuropathy. *Ann N Y Acad Sci* 1043:598-604

Waller, A. (1850). "Experiments on the Section of the Glossopharyngeal and Hypoglossal Nerves of the Frog, and Observations of the Alterations Produced Thereby in the Structure of Their Primitive Fibres". *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 140 (0): 423-429

Wang Z, Gerstein M, Snyder M (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 10(1):57-63

Watson E, Hahm S, Mizuno TM, Windsor J, Montgomery C, Scherer PE, Mobbs CV, Salton SR (2005). VGF ablation blocks the development of hyperinsulinemia and hyperglycemia in several mouse models of obesity. *Endocrinology* 146(12):5151-5163

Weiwei Z, Hu R (2009). Targeting carbonic anhydrase to treat diabetic retinopathy: emerging evidences and encouraging results. *Biochem Biophys Res Commun* 390(3):368-371

van der Werf N, Kroese FG, Rozing J, Hillebrands JL (2007). Viral infections as potential triggers of type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 23(3):169-183

Whitehead J, Keller-Peck C, Kucera J, Tourtellotte WG (2005). Glial cell-line derived neurotrophic factor-dependent fusimotor neuron survival during development. *Mech Dev* 122(1):27-41

Wu P, Sato J, Zhao Y, Jaskiewicz J, Popov KM, Harris RA (1998). Starvation and diabetes increase the amount of pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 4 in rat heart. *Biochem J* 329 (Pt 1):197-201

-X-

Xiao HS, Huang QH, Zhang FX, Bao L, Lu YJ, Guo C, Yang L, Huang WJ, Fu G, Xu SH, Cheng XP, Yan Q, Zhu ZD, Zhang X, Chen Z, Han ZG, Zhang X (2002). Identification of gene expression profile of dorsal root ganglion in the rat peripheral axotomy model of neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci* 99: 8360-8365

Xu G, Pierson CR, Murakawa Y, Sima AA (2002). Altered tubulin and neurofilament expression and impaired axonal growth in diabetic nerve regeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* 61(2):164-175

Xu X, Yang X, Zhang P, Chen X, Liu H, Li Z (2012). Effects of exogenous galanin on neuropathic pain state and change of galanin and its receptors in DRG and SDH after sciatic nerve-pinch injury in rat. *PLoS One* 7(5):e37621

-Y-

Yang Y, Xie Y, Chai H, Fan M, Liu S, Liu H, Bruce I, Wu W (2006). Microarray analysis of gene expression patterns in adult spinal motoneurons after different types of axonal injuries. *Brain Res* 23;1075(1):1-12

Yang CZ, Zhao R, Dong Y, Chen XQ, Yu AC (2008). Astrocyte and neuron intone through glutamate. *Neurochem Res* 33(12):2480-2486

Yamagishi S, Uehara K, Otsuki S, Yagihashi S (2003). Differential influence of increased polyol pathway on protein kinase C expressions between endoneurial and epineurial tissues in diabetic mice. *J Neurochem* 87(2):497-507

Yasuda H, Terada M, Taniguchi Y, Sasaki T, Maeda K, Haneda M, Kashiwagi A, Kikkawa R (1999). Impaired regeneration and no amelioration with aldose reductase inhibitor in crushed unmyelinated nerve fibers of diabetic rats. *Neuroreport* 10(11):2405-2409

Yasuda H, Terada M, Maeda K, Kogawa S, Sanda M, Haneda M, Kashiwagi A, Kikkawa R (2003). Diabetic neuropathy and nerve regeneration. *Prog Neurobiol* 69:229-285

Yuan H, Xu S, Wang Y, Xu H, Wang C, Zhu Q, Yang RK, Chen X, Yang PC, Shi X (2010). Corticotrophin-releasing hormone (CRH) facilitates axon outgrowth. *Spinal Cord* 48(12):850-856

-Z-

Zhai Q, Wang J, Kim A, Liu Q, Watts R, Hoopfer E, Mitchison T, Luo L, He Z (2003). Involvement of the ubiquitin-proteasome system in the early stages of wallerian degeneration. *Neuron* 39(2):217-225

Zhang JY, Luo XG, Xian CJ, Liu ZH, Zhou XF (2000). Endogenous BDNF is required for myelination and regeneration of injured sciatic nerve in rodents. *Eur J Neurosci* 12(12):4171-4180

Zhang W, Miao Y, Xing Z, Li H, Liu H, Li Z (2013). Growth-associated protein-43 expression in cocultures of dorsal root ganglion neurons and skeletal muscle cells with different neurotrophins. *Muscle Nerve* 47(6):909-915

Zheng WH, Kar S, Quirion R (2002). Insulin-like growth factor-1-induced phosphorylation of transcription factor FKHRL1 is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase/Akt kinase and role of this pathway in insulin-like growth factor-1-induced survival of cultured hippocampal neurons. *Mol Pharmacol* 62(2):225-233

Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR (1998). Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 393(6685):595-599

