

Universidad CEU Cardenal Herrera

Departamento de Ciencias Biomédicas



**“Encefalopatía diabética en un modelo
experimental: progresión temporal.”**

TESIS DOCTORAL

Presentada por: Dña. Raquel-Ana Álvarez Nölting

Dirigida por: Dra. Dña. María Miranda Sanz

Dr. D. Francisco Javier Romero Gómez

**VALENCIA
2013**

Este trabajo ha sido realizado gracias a las ayudas de:

- Ministerio de Ciencia e Innovación: proyecto SAF2010/21317.
- Ministerio de Sanidad y Consumo, Plan Nacional sobre Drogas: proyecto 2010/059.
- Generalitat Valenciana, Consellería de Sanidad: proyecto AP-120/09
- Universidad Cardenal Herrera-CEU: proyectos PRUCH 2008, PRUCH 2009 y COPERNICUS CEU-UCH / SANTANDER 2008-2010.
- Beca FPI de la Universidad CEU-Cardenal Herrera.
- Beca FPI de la Generalitat Valenciana, Consellería de Educación.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar y aunque sea poco común quiero darle gracias a Dios por TODO. Por tantos regalos y detalles, por todas las personas que ha puesto en mi vida y por todo lo que ha hecho conmigo durante este tiempo.

Gracias a mi marido, Alberto, porque sin duda tu apoyo ha sido fundamental en la última fase de la tesis, cuando me han faltado los ánimos. Porque desde un principio, cuando éramos novios y venías a “secuestrarme” al laboratorio, me has dicho la verdad y me has ayudado muchísimo a ordenar mis prioridades. Gracias por tantísimos momentos en los que me he podido desahogar contigo y me has ayudado a ser un poco más objetiva y me has animado. Gracias a mi hija Esther, porque ya desde tu embarazo también me ayudaste a no perder de vista lo importante y a defender mi familia por encima de otras cosas. Gracias a los dos, porque todos los días me ayudáis a convertirme en esposa y madre.

Gracias a mis directores, María Miranda y Javier Romero. Gracias María, por tu constancia, paciencia, dedicación y comprensión. Gracias por no haber desesperado todas las veces que yo tiré la toalla y por haber encontrado siempre una solución más fácil. No tengo palabras suficientes para agradecerte lo comprensiva que has sido conmigo, especialmente desde el embarazo de Esther en adelante, y por lo fácil que me has puesto las cosas (supongo que tantas veces a costa de tu tiempo y de darte más preocupaciones). Gracias Javier, por darme la oportunidad de conocer el mundo de la investigación y porque apostaste por mí desde un principio. Gracias porque siempre me has tratado con delicadeza.

Gracias a mi familia: a mis padres, suegros, a cada uno de mis hermanos, cuñados, sobrinos, tíos, primos, etc. Gracias a mis padres, por todo lo que he recibido de vosotros, porque también me habéis dicho la verdad y me habéis aconsejado en los momentos de duda. Gracias a mis hermanos, por darle un toque de humor a las rarezas y sacrificios de un científico. Gracias también por vuestros consejos, apoyo y vuestras oraciones. Gracias a mis suegros y cuñados, por vuestra disponibilidad, por cómo habéis cuidado a Esther y me habéis facilitado tantísimo el tramo final de la tesis. No me cabe duda de que sin vuestra ayuda y facilidades no habría llegado hasta aquí.

Gracias a mis compañeros del laboratorio, que han trabajado codo con codo conmigo en la bancada y tanto he aprendido de ellos:

- Gracias Rosa, por todo lo que me has enseñado y ayudado, porque tú también me has dicho la verdad, por tu amistad. Gracias Violeta, por ser mi cómplice (nunca se me olvidará nuestra aventura en el congreso de Alemania), por escucharme, comprenderme y ayudarme tantas veces. Gracias Inma, por todo lo que me has enseñado y porque siempre has estado dispuesta a ayudar. Gracias Teresa, por darle un aire fresco al laboratorio, por todas las tardes que me ayudaste a darles el tratamiento a las ratas y amenizaste las horas de trabajo. Gracias Mariví, por todo lo que he aprendido de ti, porque me has enseñado con mucha paciencia y dedicación. Gracias Miguel, por toda la ayuda que me has dado, especialmente por hacerte cargo de esa última tanda de ratas. Gracias Jorge, por tus conocimientos de Neuroanatomía, por tantas horas de matanza a pie de cañón, diseccionando cerebros y perfundiendo ratas. Gracias a Sara y Sole, las primas de Castellón, aunque no he coincidido mucho con vosotras en este último periodo, os agradezco muchísimo vuestra ayuda y disponibilidad. Gracias también a tantísimas otras personas que pertenecieron al equipo de investigación y me han ayudado y enseñado a lo largo de estos años: Paco Bosch, María Muriach, Samuel e Isabel (me habéis ayudado muchísimo con vuestra forma de vivir las cosas), Leticia (gracias especialmente por tu ayuda y comprensión en la fase de corrección de la tesis), José Manuel Genovés (por tu ayuda con los electros), Brenda, José Miguel, Raquel Carcelén.

- Gracias al grupo de Bioquímica: Nacho, Enric, Pilar, Bego, Olga, Mocholí, Juana, Marta Lonjedo, Marta H., Juanjo, Laura, etc. Gracias a Nacho y Enric, por solucionarme siempre las dudas que os preguntaba. Gracias Bego, por enseñarme con tanta paciencia sobre western e inmuno. Gracias Mocholí, por enseñarme a coger y manipular ratones en mis inicios. Gracias Pilar, porque como Inma, siempre estabas dispuesta a ayudar. Gracias a Marta H., mi compañera de beca de Consellería, por ir delante de mí y avisarme de todos los papeleos y trámites burocráticos que se me escapaban.

- Gracias al grupo de Tecnología Farmacéutica: Alicia, Andrés, Cristina, Aracely, César, Sergio y María. Gracias Aracely, mi compañera de despacho. Ese tiempo que compartimos despacho lo recuerdo con muchísimo cariño, me encantó conocerte. Gracias Cristina Balaguer, vecina de despacho, por esas conversaciones sobre la

maternidad. Gracias César y Sergio, porque vosotros también le habéis dado un aire fresco al laboratorio y lo habéis amenizado en tantos momentos, ¡menudo dúo!

- Gracias también al grupo de Parasitología, a Marusi, Teresa Olivar y demás. Gracias por compartir vuestro espacio, conocimientos y aparatos en las horas en las que estaba delante del HPLC.

- Gracias a los técnicos de laboratorio: José Antonio, Cristina, Vanesa y Ana. Gracias José Antonio por encontrar eficazmente soluciones a todos los contratiempos que me iban surgiendo en el laboratorio. Gracias por todos los pedidos a última hora y por las máscaras para la alergia. Gracias Cristina, Vanesa y Ana, por todos los favores que os he pedido. Gracias Cristina por los ratos de charla y por dejarme el carro tantas veces.

- Gracias Lorena, por acudir rápidamente y ayudarnos cuando se inundaba la pila y se llenaba de agua el laboratorio.

Gracias también al personal del CEU que en tantos momentos me ha facilitado las cosas y me ha hecho darme cuenta de que estaba rodeada de gente dispuesta a ayudarme. Gracias Pepa, Victoria Vallés, Sara Marqués, Inma Casaña, Ana Dolz, Gerardo, Verónica, David Viana, personal de informática, etc.

Gracias a María Sancho-Tello, porque tú me iniciaste en el mundo de la investigación: me enseñaste a coger una pipeta, a cortar en el criostato, hacer placas ELISA, anotar organizadamente en la libreta todo lo que hacía, utilizar el Excel y el Endnote, etc. Gracias por la paciencia y dedicación con las que me enseñaste todo esto, estuve muy a gusto ese tiempo de aprendizaje en la FOM.

Gracias a las chicas de la FOM: Leticia, Diana, Emma y Siv. Gracias Leticia por enseñarme a cortar, teñir, montar, etc. Gracias por los ratos que me habéis dejado un hueco allí con vosotras y por las horas que os he robado en el microscopio de fluorescencia. Gracias Diana por enseñarme a hacer inmunes, por llevarme a casa y recogerme tantas veces, porque siempre has estado dispuesta a ayudarme y por todo el tiempo que me has dedicado. Gracias Emma por enseñarme a manejar las ratas diabéticas y por el relevo que hiciste. Gracias Siv por enseñarme a darle un enfoque distinto a los resultados y por esas conversaciones sobre la educación de los hijos. Gracias también a Amparo Navea, Juan Carlos y Manolo Díaz, por darme la primera

oportunidad de empezar como becaria de colaboración en el laboratorio de la FOM. Gracias al personal de mantenimiento, administración, a los informáticos y demás personal de la FOM: Carlos, Jose, Alex, Pablo, Carlos Orus, Rosa Llopis, Rosa Martí, Gisela, Isabel, Desa, Toni, Fernando, Brenda, Loli, etc. Gracias por echarme una mano cuando las cosas se han puesto en mi contra y se hacían complicadas.

Y por último y no menos importante, gracias a mi antigua comunidad de San Isidoro y a mi actual comunidad de Santo Tomás. Gracias por vuestras oraciones y vuestra preocupación. Gracias a Elena Juaristi, por ser mi cómplice durante la época que estuve en el despacho de la biblioteca y por todas las veces que me recogiste y llevaste al CEU. Gracias también a Andrés Cantos, porque con tu discernimiento me has animado y ayudado a acabar esta fase de la tesis.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	1
ÍNDICE DE FIGURAS	2
LISTA DE ABREVIATURAS	5
INTRODUCCIÓN	11
1. DIABETES MELLITUS	11
1.1. DEFINICIÓN.....	11
1.2. CLASIFICACIÓN	12
1.3. TRATAMIENTO.....	13
1.3.1. Insulina y antidiabéticos orales.....	13
1.3.2. Nuevas tendencias en el tratamiento de la diabetes	14
2. ENCEFALOPATÍA DIABÉTICA	15
2.1. INTRODUCCIÓN	15
2.2. ETIOLOGÍA DE LA ENCEFALOPATÍA DIABÉTICA	16
2.2.1. Hiper glucemia	16
2.2.2. Hipoglucemia	18
2.2.3. Enfermedad vascular.....	18
2.2.4. Resistencia a insulina.....	19
2.3. ASPECTOS ESPECÍFICOS DEL HIPOCAMPO	20
2.3.1. Anatomía e Histología del Hipocampo.....	20
2.3.2. Circuito hipocampal.....	22
2.3.3. Hipocampo y memoria.....	23
2.3.4. Plasticidad sináptica: PLP y DLP	24
2.3.5. Mecanismos moleculares de la memoria	25
2.3.6. Estudios de memoria y aprendizaje	26
2.3.7. Mecanismos moleculares de la encefalopatía diabética	26
2.3.7.1. Apoptosis en el hipocampo diabético.....	28
2.3.7.2. Función sináptica en el hipocampo diabético	28
2.4. ALTERACIONES MORFOLÓGICAS Y FUNCIONALES EN LA ENCEFALOPATÍA DIABÉTICA.....	30
2.5. DIAGNÓSTICO DE LA ENCEFALOPATÍA DIABÉTICA.....	31
2.6. TRATAMIENTO DE LA ENCEFALOPATÍA DIABÉTICA	32
2.6.1. Control glucémico	32
2.6.2. Antioxidantes.....	32
2.6.3. Hormonas	33
2.6.4. Fármacos	33

3. PAPEL DE LA NEUROGÉNESIS EN LA ENCEFALOPATÍA DIABÉTICA.....	34
3.1. DEFINICIÓN DE NEUROGÉNESIS.....	34
3.2. TÉCNICA DE MEDIDA DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR: BrdU.....	35
3.3. NEUROGÉNESIS EN HIPOCAMPO.....	35
3.4. NEUROGÉNESIS Y DIABETES.....	36
4. FISIOLÓGÍA DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA ENCEFALOPATÍA DIABÉTICA.....	37
4.1. ESTRÉS OXIDATIVO. RADICALES LIBRES.....	37
4.1.1. Generación de radicales libres.....	37
4.1.2. Papel fisiológico y patológico.....	37
4.2. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA.....	38
4.2.1. Malondialdehído (MDA).....	39
4.3. DEFENSA ANTIOXIDANTE.....	39
4.3.1. Sistemas antioxidantes de importancia biológica.....	39
4.3.2. El sistema glutatión.....	40
4.4. ESTRÉS OXIDATIVO Y DIABETES.....	41
4.4.1. Estrés oxidativo y encefalopatía diabética.....	43
4.4.2. Estrés oxidativo y neurogénesis.....	43
5. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN Y SU IMPLICACIÓN EN LA ENCEFALOPATÍA DIABÉTICA.....	44
5.1. FACTOR NUCLEAR KAPPA B (NF-κB).....	44
5.1.1. Definición y funciones.....	44
5.1.2. NF-κB y diabetes.....	45
5.2. PROTEÍNA DE UNIÓN AL ELEMENTO DE RESPUESTA DE AMPc (CREB).....	46
5.2.1. Definición y funciones.....	46
5.2.2. CREB y diabetes.....	47
5.3. FACTOR RELACIONADO CON EL FACTOR NUCLEAR ERITROIDE 2 (NRF2) ..	48
5.3.1. Definición y funciones.....	48
5.3.2. Nrf2 y diabetes.....	49
5.4. INHIBIDOR DE QUINASAS DEPENDIENTES DE CICLINAS p21.....	50
5.4.1. Definición y funciones.....	50
5.4.2. p21 y diabetes.....	51
HIPÓTESIS.....	55
OBJETIVOS.....	59
MATERIAL Y MÉTODOS.....	63
1. MODELO EXPERIMENTAL.....	63
1.1. ESTABULACIÓN Y MANEJO DE LOS ANIMALES.....	63

1.2. DISEÑO EXPERIMENTAL	63
2. OBTENCIÓN Y PROCESADO DE MUESTRAS	64
2.1. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS	64
2.2. DETECCIONES INMUNOHISTOQUÍMICAS	65
3. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS	65
3.1. DETERMINACIÓN DE LA GLUCEMIA.....	65
3.2. DETERMINACIÓN DE LA HEMOGLOBINA GLICOSILADA.....	66
3.2.1. Fundamento del método.....	66
3.2.2. Soluciones	66
3.2.3. Procedimiento.....	66
3.3. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE LOWRY	67
3.3.1. Fundamento del método.....	67
3.3.2. Soluciones	67
3.3.3. Procedimiento.....	67
3.4. DETERMINACIÓN DE MALONDIALDEHÍDO	68
3.4.1. Fundamento del método.....	68
3.4.2. Equipo y soluciones	68
3.4.3. Procedimiento.....	69
3.5. DETERMINACIÓN DE GLUTATIÓN.....	70
3.5.1. Fundamento del método.....	70
3.5.2. Equipo y soluciones	70
3.5.3. Procedimiento.....	71
3.6. DETERMINACIONES INMUNOHISTOQUÍMICAS	72
3.6.1. INMUNOHISTOQUIMICA BrdU.....	72
3.6.1.1. Fundamento del método	72
3.6.1.2. Soluciones	72
3.6.1.3. Procedimiento	72
3.6.1.4. Recuento.....	73
3.6.2. INMUNOFLUORESCENCIA.....	74
3.6.2.1. Procedimiento	74
3.6.2.2. Recuento.....	75
4. TEST DEL LABERINTO DE AGUA DE MORRIS.....	76
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	77
RESULTADOS	81
1. VARIABLES DESCRIPTIVAS: PESO, GLUCEMIA y HbA1c.....	81
1.1. VARIACIÓN DEL PESO	81
1.2. ESTUDIO DE LA GLUCEMIA SANGUÍNEA.....	81

1.3. ESTUDIO DE LA HEMOGLOBINA GLICOSILADA (HbA1c).....	81
2. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS INDICADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO	82
2.1. ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUTATIÓN EN HOMOGENADO DE HIPOCAMPO	82
2.2. ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE MALONDIALDEHÍDO EN HOMOGENADO DE HIPOCAMPO	83
2.3. CORRELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE MDA Y GSH EN HOMOGENADO DE HIPOCAMPO	85
3. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO	86
3.1. DETERMINACIÓN DEL MARCAJE DE BrdU EN HIPOCAMPO.....	86
3.2. DETERMINACIÓN DEL MARCAJE DE NF- κ B EN HIPOCAMPO	88
3.3. DETERMINACIÓN DEL MARCAJE DE CREB EN HIPOCAMPO	90
3.4. DETERMINACIÓN DEL MARCAJE DE pCREB EN HIPOCAMPO	92
3.5. DETERMINACIÓN DEL MARCAJE DE Nrf2 EN HIPOCAMPO	94
3.6. DETERMINACIÓN DEL MARCAJE DE p21 EN HIPOCAMPO	96
3.7. CORRELACIONES DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN ENTRE SÍ	98
4. ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO.....	100
4.1. TEST DEL LABERINTO DE AGUA DE MORRIS	100
4.2. CORRELACIONES ENTRE LA LATENCIA ACUMULADA DE MORRIS Y ALGUNOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN	101
DISCUSIÓN	105
1. VARIABLES DESCRIPTIVAS DEL MODELO EXPERIMENTAL	105
2. IMPLICACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA ENCEFALOPATÍA DIABÉTICA	106
3. ALTERACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN NEURONAL EN EL GIRO DENTADO	108
4. CAMBIOS MOLECULARES QUE SUBYACEN LA ENCEFALOPATÍA DIABÉTICA: FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN.....	109
4.1. NF- κ B.....	109
4.2. CREB Y pCREB	111
4.3. Nrf2	112
4.4. p21.....	114
5. MECANISMOS IMPLICADOS EN LOS DÉFICIT DE APRENDIZAJE Y MEMORIA..	116
CONCLUSIONES	121
BIBLIOGRAFÍA	125
ANEXO	149

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Listado de anticuerpos primarios y secundarios empleados para inmunofluorescencia.....	75
Tabla 2. Relación de peso (g), glucemia (mg/dl) y porcentaje de hemoglobina glicosilada (%HbA1c) de todos los grupos al finalizar el experimento.	82
Tabla 3. Parámetros bioquímicos obtenidos a partir del homogenado de hipocampo de todos los grupos al finalizar el experimento.	83
Tabla 4. Valores del recuento de células BrdU positivas en la zona subgranular (SGZ) del Giro Dentado del hipocampo en los diferentes grupos.....	86
Tabla 5. Valores del recuento de células NF- κ B positivas en el Giro Dentado del hipocampo en los diferentes grupos.	88
Tabla 6. Valores del recuento de células CREB positivas en el Giro Dentado del hipocampo en los diferentes grupos.	90
Tabla 7. Valores del recuento de células pCREB positivas en el Giro Dentado del hipocampo en los diferentes grupos.	92
Tabla 8. Valores del recuento de células Nrf2 positivas en el Giro Dentado del hipocampo en los diferentes grupos.	94
Tabla 9. Valores del recuento de células p21 positivas en el Giro Dentado del hipocampo en los diferentes grupos.	96
Tabla 10. Latencia acumulada (s) en alcanzar la plataforma del laberinto de agua de Morris.	100

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de los factores de riesgo que contribuyen al desarrollo de la disfunción cognitiva en la diabetes.	17
Figura 2. Microfotografía de una sección cerebral del hipocampo de ratón, teñido por la doble tinción de Timm-Nissl.....	21
Figura 3. Diagrama básico del circuito hipocampal.	23
Figura 4. Mecanismos moleculares que subyacen la encefalopatía en la diabetes tipo 1	27
Figura 5. Mecanismos que subyacen a los déficits en la plasticidad sináptica por la diabetes.	29
Figura 6. Esquema de la piscina del laberinto de agua de Morris.	76
Figura 7. Comparación de la concentración de GSH (nmol/mg proteína) obtenida a partir del homogenado de hipocampo de todos los grupos al finalizar el experimento.	84
Figura 8. Comparación de la concentración de MDA (nmol/mg proteína) obtenida a partir del homogenado de hipocampo de todos los grupos al finalizar el experimento.	84
Figura 9. Correlación entre la concentración de GSH (nmol/mg proteína) y la concentración de MDA (nmol/mg proteína) en homogenado de hipocampo de todos los grupos.....	85
Figura 10. Células BrdU positivas en la zona subgranular (SGZ) del Giro Dentado del hipocampo de todos los grupos.....	87
Figura 11. Fotografía de los cortes histológicos que muestra el marcaje de células BrdU positivas en la SGZ del Giro Dentado del hipocampo de todos los grupos.	87
Figura 12. Células NF- κ B positivas en el Giro Dentado del hipocampo de todos los grupos.	89
Figura 13. Fotografía de los cortes histológicos que muestra el marcaje de las células NF- κ B positivas en el Giro Dentado del hipocampo de todos los grupos.....	89
Figura 14. Células CREB positivas en el Giro Dentado del hipocampo de todos los grupos.	91
Figura 15. Fotografía de los cortes histológicos que muestra el marcaje de las células CREB positivas en el Giro Dentado del hipocampo de todos los grupos.	91

Figura 16. Células pCREB positivas en el Giro Dentado del hipocampo de todos los grupos.	93
Figura 17. Fotografía de los cortes histológicos que muestra el marcaje de las células pCREB positivas en el Giro Dentado del hipocampo de todos los grupos.	93
Figura 18. Células Nrf2 positivas en el Giro Dentado del hipocampo de todos los grupos.	95
Figura 19. Fotografía de los cortes histológicos que muestra el marcaje de las células Nrf2 positivas en el Giro Dentado del hipocampo de todos los grupos.	95
Figura 20. Células p21 positivas en el Giro Dentado del hipocampo de todos los grupos.	97
Figura 21. Fotografía de los cortes histológicos que muestra el marcaje de las células p21 positivas en el Giro Dentado del hipocampo de todos los grupos.	97
Figura 22. Correlación entre el recuento de células p21 positivas del Giro Dentado (células positivas/UAA) y de células Nrf2 positivas de todos los grupos.	98
Figura 23. Correlación entre el recuento de células pCREB positivas del Giro Dentado (células positivas/UAA) y de células NF- κ B positivas de todos los grupos.	99
Figura 24. Correlación entre el recuento de células NF- κ B positivas del Giro Dentado (células positivas/UAA) y de células BrdU positivas de todos los grupos.	99
Figura 25. Latencia acumulada (s) en alcanzar la plataforma en el test de memoria (laberinto de agua de Morris).	101
Figura 26. Correlación entre la latencia acumulada en el laberinto de agua (s) y las células BrdU positivas de la SGZ del Giro Dentado (células positivas/UAA) de todos los grupos.	102
Figura 27. Correlación entre la latencia acumulada en el laberinto de agua de Morris (s) y las células pCREB positivas en el Giro Dentado (células positivas/UAA) de todos los grupos.	102

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC: Complejo avidina-biotina.

AC: Enzima Adenilato Ciclasa.

ADA: (*American Diabetes Association*) Asociación Americana de Diabetes.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

AGE-RAGE: (*Receptors of advanced glycation end products*) interacción entre los AGEs y sus receptores.

AGEs: (*Advanced glycation end products*) productos finales de glicación no enzimática.

ALC: Acetil-l-carnitina.

AMPA: Receptor de glutamato ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metilisoxazolepropionico.

ARE: Elementos de respuesta antioxidante (región de ADN).

BDNF: Factor neurotrófico derivado de cerebro.

BrdU: Bromodeoxiuridina (5-bromo-2-deoxiuridina).

BSA: Albúmina sérica bovina.

CA1, CA2, CA3 y CA4: Cuerno de Ammon, regiones CA1, CA2, CA3 y CA4.

CaMIV: Enzima calmodulina dependiente de Ca^{2+} IV.

CAMKII: Enzima Ca^{2+} /calmodulina quinasa II.

CDKs: Enzimas quinasas dependientes de ciclinas.

CGL: Capa granular.

CKIs: Inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas.

CNC: *Cap n collar*.

CRE: Elemento de respuesta del AMPc (región de ADN).

CREB: Proteína de unión a CRE (al elemento de respuesta de AMPc).

DAB: Diaminobencidina.

DACD: (*Diabetes associated cognitive decline*) deterioro cognitivo asociado a la diabetes.

DCCT/EDIC: (*Diabetes Control Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions, Complications Study Research Group*). Ensayo sobre el control de la diabetes y sus complicaciones/ epidemiología de las intervenciones de la diabetes.

DNFB: 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno.

eNOS: Enzima óxido nítrico sintasa endotelial.

ERG: Electrorretinograma.

ERK: Enzima quinasa dependiente de señales extracelulares.

ETDRS: (*Early Treatment Diabetic Retinopathy Study*) estudio temprano sobre el tratamiento de la retinopatía diabética.

fMRI: Resonancia magnética funcional.

GABA: Neurotransmisor ácido gamma-aminobutírico.

GC: Células ganglionares.

GD: Giro Dentado.

GLP-1: Péptido similar al glucagón tipo 1.

GluR1: Receptor de glutamato 1, pertenece a la familia de receptores AMPA.

GLUT-2: Transportador de glucosa.

GPx: Enzima Glutación peroxidasa.

GSH: Glutación (forma reducida).

GSK-3 β : Enzima glicógeno sintasa quinasa 3 beta.

GSSG: Forma oxidada del glutatión.

HbA1c: Hemoglobina glicosilada.

HLA-D: Antígeno leucocitario humano.

HNE: Hidroxinonenal.

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución.

IGF-1: Factor de crecimiento insulínico 1.

IGFBP-3: Proteína de unión al factor de crecimiento insulínico 3.

IKKs: Enzimas I κ B quinasas.

I κ B: Proteína inhibitoria de kappa B.

Keap1: *Kelch-like ECH-associated protein 1*.

LDT/ DLP: (*Long term depression*) Depresión a largo plazo.

LTP/ PLP: (*Long term potentiation*) Potenciación a largo plazo.

MDA: Malondialdehído.

MEK: Enzima quinasa que fosforila a MAPK/ERK.

MRI: Resonancia magnética de imagen.

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

NF-E2: Factor nuclear eritroide 2.

NF- κ B: Factor nuclear kappa B.

NGF: Factor de crecimiento neurotrófico.

NMDA: Receptor de glutamato N-Metil-D-Aspartato.

NO: Óxido nítrico.

NPH: *Neutral Protamine Hagedorn*.

Nrf2: Factor nuclear relacionado con el Factor Eritroide 2 (NF-E2).

NeuN: *Neuron specific nuclear protein*.

\cdot OH: Radical hidroxilo.

OPs: Potenciales oscilatorios.

p38 MAPK: Proteínas quinasas activadas por mitógeno p38.

PBS: Tampón fosfato salino.

PCA: Ácido perclórico.

pCREB: Fosfo-CREB.

PET: Tomografía de emisión de positrones.

PFA: Paraformaldehído.

PI-3 quinasa: Enzima fosfoinositol-3 quinasa.

PKA: Enzima Proteína Quinasa A.

PKC: Enzima Proteína Quinasa C.

PPAR γ : Receptor activado por proliferador de peroxisoma gamma.

RAGEs: (*Receptors of advanced glycation end products*) receptores de AGEs, de los productos finales de glicación no enzimática.

ROS: Especies reactivas del oxígeno.

Rsk-2: Enzima quinasa 6S ribosomal 2.

SAPK/JNK: Proteínas quinasas activadas por estrés/Jun amino terminal quinasas.

SGZ: Zona Subgranular.

-SH: Grupo tiol reducido.

SNC: Sistema nervioso central.

SOD: Enzima superóxido dismutasa.

STZ: Estreptozotocina.

TBARS: Ácido tiobarbitúrico.

TNF- α : factor de necrosis tumoral α .

UAA: Unidades arbitrarias de área.

INTRODUCCIÓN

1. DIABETES MELLITUS

1.1. DEFINICIÓN

La Diabetes Mellitus es un síndrome clínico que se caracteriza por la hiperglucemia que resulta de la deficiencia en la secreción o en la acción de la insulina. Es un desequilibrio crónico de la acción de la insulina y del metabolismo de los carbohidratos. La insulina es una hormona secretada por las células β de los islotes de Langerhans del páncreas, que permite la utilización de la glucosa en los tejidos.

Los procesos patogénicos que están implicados en el desarrollo de la diabetes son varios y van desde la destrucción autoinmune de las células β del páncreas hasta situaciones en las que se observa resistencia a la insulina. Frecuentemente coexisten en el mismo paciente los defectos en la secreción de insulina y los defectos en su acción, resultando difícil saber cuál de las dos es la causa primaria de la hiperglucemia.

La hiperglucemia es la causa de los síntomas característicos de la diabetes mal controlada: poliuria (volumen de orina excesivo), polidipsia (aumento anormal de la sed), pérdida de peso y, en ocasiones, polifagia (aumento anormal de la necesidad de comer) y visión borrosa. Pueden existir alteraciones en el crecimiento y susceptibilidad a ciertas infecciones. Igualmente, es frecuente en pacientes diabéticos la aparición de episodios de hipoglucemia, sobre todo en aquellos de reciente diagnóstico que utilizan insulina para su control.

Las complicaciones crónicas de la enfermedad son consecuencia del metabolismo anormal tanto de la glucosa como de las proteínas y los lípidos (Millan *et al.*, 1984). A largo plazo la hiperglucemia provoca daño en varios órganos, viéndose especialmente afectados los nervios (neuropatía) y los vasos de menor calibre (microangiopatía) tanto de la retina (retinopatía) como de los glomérulos renales (nefropatía). Con el tiempo, el mal control de la diabetes acelera el proceso aterógeno (macroangiopatía) que puede afectar a las arterias coronarias, cerebrales y periféricas, sobre todo, las de las extremidades inferiores (Millan *et al.*, 1984; Kilpatrick *et al.*, 2006).

La principal causa de muerte entre los pacientes diabéticos son las enfermedades cardiovasculares, que son de dos a cuatro veces más comunes en diabéticos que en no diabéticos.

1.2. CLASIFICACIÓN

Adoptamos la clasificación recomendada por la *American Diabetes Association* (ADA), la cual introduce algunos cambios a la clasificación de 1979 del Grupo Nacional de Datos sobre la Diabetes (*American Diabetes Association: Clinical Practice Recommendations*, 2010) (American Diabetes Association, 2010).

I. Diabetes tipo 1 o dependiente de insulina: producida por la destrucción (autoinmune o idiopática) de las células β del páncreas que conduce normalmente a la deficiencia absoluta de insulina. El riesgo de sufrir diabetes tipo 1 se relaciona con ciertos genes de la región del antígeno leucocitario humano D (HLA-D) del complejo mayor de histocompatibilidad, que se localiza en el cromosoma 6 (Huang *et al.*, 1996). Afecta al 5-10 % de los casos de pacientes diabéticos. La diabetes tipo 1 se da más comúnmente en la infancia o en la adolescencia, y siempre requiere tratamiento con insulina sustitutiva.

II. Diabetes tipo 2 o no dependiente de insulina: es un trastorno metabólico heterogéneo, caracterizado por una sensibilidad reducida y una deficiencia relativa de insulina. Los tejidos periféricos que son resistentes a la insulina, no captan correctamente la glucosa y ello conlleva elevados niveles de glucosa en sangre (hiperglucemia). Hay varios trastornos que coexisten y pueden contribuir a la severidad de la diabetes tipo 2 como son: obesidad, hipertensión, dislipemia y anomalías en el eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) que llevan a una pérdida de la regulación de los niveles de cortisol.

III. Otros tipos específicos:

- A. Defectos genéticos de la función de las células β .
- B. Defectos genéticos de la acción de la insulina.
- C. Enfermedades del páncreas exocrino.
- D. Enfermedades endocrinas.
- E. Inducida por medicamentos o sustancias químicas.
- F. Infecciones.
- G. Formas poco comunes de diabetes mediada por alteraciones inmunológicas.
- H. Otros síndromes genéticos que en ocasiones se relacionan con diabetes.

IV. Diabetes Mellitus gestacional: se trata de cualquier grado de intolerancia a la glucosa que aparece, o es reconocido por primera vez, durante la gestación.

1.3. TRATAMIENTO

Al iniciar el tratamiento de un paciente diabético es importante mejorar los síntomas atribuibles a la diabetes y evitar las consecuencias graves a corto plazo que puede tener un control glucémico deficiente. Posteriormente, la atención continua del paciente diabético conlleva dos objetivos: mantener corregido el desequilibrio metabólico (principalmente manteniendo normales los niveles de glucosa y de hemoglobina glicosilada en sangre) y prevenir las complicaciones crónicas.

Tradicionalmente el tratamiento de la diabetes mellitus se ha basado en la dieta, la insulina, los hipoglucemiantes orales, el ejercicio físico, la educación del paciente y la autovigilancia de la glucemia.

Para evitar las secuelas de las complicaciones de la diabetes, es importante su detección temprana con el fin de iniciar cuanto antes los tratamientos adicionales que previenen las lesiones (como la fotocoagulación para prevenir la ceguera) o que modifican de forma favorable el curso de la complicación (antihipertensivos en nefropatía).

1.3.1. Insulina y antidiabéticos orales:

La insulina es una hormona que se produce en las células β de los islotes de Langerhans del páncreas, y permite la utilización de la glucosa en los tejidos.

La insulina está indicada en los pacientes con diabetes tipo 1 en los que la producción de insulina está muy disminuida o es nula, siendo necesaria su aplicación para la supervivencia. También se aplica en situaciones especiales en diabéticos tipo 2, en algunos casos de diabetes secundaria a otras enfermedades y, con frecuencia, en la diabetes gestacional.

La insulina, debido a su estructura proteica, es hidrolizada por los jugos gastrointestinales y no puede ser administrada por vía oral. Tampoco puede administrarse por las mucosas. En general, se administra por vía subcutánea, pero con la

insulina regular de acción rápida se pueden utilizar otras vías como la intramuscular, intravenosa e intraperitoneal.

Existe una gran diversidad de antidiabéticos orales cuyo mecanismo de acción se basa en aumentar la secreción de insulina o la sensibilidad del tejido a ésta. Las sulfonilureas actúan aumentando la secreción de insulina, mientras que la metformina y los inhibidores de la α -glucosidasa (toglitzone, pioglitazone y rosglitazone) aumentan la sensibilidad del tejido a la acción de la insulina.

La hiperglucemia crónica, asociada con un tratamiento de insulina inadecuado, aumenta el riesgo de padecer complicaciones microvasculares como la retinopatía, neuropatía y nefropatía. El tratamiento intensivo con insulina, diseñado para alcanzar un buen control glucémico, minimiza el riesgo y la gravedad de estas complicaciones, pero a costa de un riesgo de hipoglucemia severo (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1997). La hipoglucemia severa puede atribuirse en parte a las limitaciones en el tratamiento con insulina y afecta gravemente a las respuestas fisiológicas, sintomáticas y de comportamiento de los individuos con diabetes tipo 1 (McCrimmon & Sherwin, 2010).

1.3.2. Nuevas tendencias en el tratamiento de la diabetes:

La estrategia actual para combatir la diabetes se centra en un control estricto de la glucemia, para prevenir o modificar el inicio y desarrollo de la enfermedad y de sus complicaciones. Pero sólo una minoría de pacientes diabéticos consigue este control estricto de los niveles de glucosa en sangre, suficiente para prevenir las complicaciones de la diabetes a largo plazo. Debido a las limitaciones de la terapia hipoglucemiante, deben desarrollarse otras estrategias (Packer *et al.*, 2000).

- Agonistas del receptor de glucagón y del GLP-1 (*glucagon like peptide* o *péptido similar al glucagón tipo 1*): se han estudiado otras dianas moleculares para el tratamiento de la diabetes como son los agonistas del receptor de glucagón, que pueden actuar como hipoglucemiantes y mejorar la sensibilidad del hígado por la insulina (Zhang & Moller, 2000) y como agonistas del GLP-1 (Marre & Penforis, 2011).

- Trasplante de islotes: consiste en reemplazar las células productoras de insulina del páncreas, que están destruidas en pacientes con diabetes tipo 1. Actualmente se está estudiando la posibilidad de generar nuevas células β (Wagner *et al.*, 2010).

- Terapia génica: consiste en reemplazar los genes defectuosos que causan la diabetes por copias sanas. Pero se presentan varias dificultades, como es el hecho de que todavía no se conocen la mayoría de los genes que causan la diabetes o la dificultad de reemplazar las copias defectuosas por otras nuevas de una manera segura.

- Uso de antioxidantes para evitar las complicaciones de la diabetes: como se mencionará a continuación, existe una estrecha relación entre las complicaciones de la diabetes y el estrés oxidativo. Es por ello que existen numerosos estudios sobre el uso de antioxidantes para paliar los efectos adversos de los radicales libres en el transcurso de la diabetes.

2. ENCEFALOPATÍA DIABÉTICA

2.1. INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus está asociada con déficits cognitivos moderados y cambios neurofisiológicos y estructurales en el cerebro, un estado que debería ser denominado como encefalopatía diabética (Biessels *et al.*, 2002). El concepto de encefalopatía diabética se introdujo hace varias décadas, ya en 1922 se propuso que existía una relación entre la diabetes y la disfunción cognitiva (Kramer *et al.*, 1998). Recientemente, Mijnhout *et al.* propusieron un nuevo término para la encefalopatía diabética: deterioro cognitivo asociado a la diabetes (DACD: *diabetes associated cognitive decline*) (Mijnhout *et al.*, 2006).

En las últimas dos décadas muchos estudios han descrito cambios neuropatológicos y comportamentales en pacientes diabéticos tipo 1 y 2, como son la disfunción cognitiva, el deterioro de la memoria y la velocidad mental, etc... (Awad *et al.*, 2004; Stewart & Liolitsa, 1999; Ryan *et al.*, 1993). También existen numerosos estudios en modelos experimentales que aportan evidencias a favor de la existencia de éstos déficits cognitivos (Biessels *et al.*, 1996; Reagan & McEwen, 2002; Sima & Li, 2005), y a su vez contribuyen a la comprensión de la patogénesis de la encefalopatía diabética.

Parece que la encefalopatía diabética difiere en la diabetes tipo 1 y en la diabetes tipo 2, debido a que los mecanismos subyacentes y la naturaleza de los déficits cognitivos resultantes son diferentes (Sima, 2010). Es por ello que algunos autores

diferencian entre encefalopatía en la diabetes tipo 1 (que tiene mayor incidencia sobre pacientes. jóvenes) de la encefalopatía en la diabetes tipo 2 (asociada al aumento de la incidencia de Alzheimer como consecuencia de la resistencia a insulina).

2.2. ETIOLOGÍA DE LA ENCEFALOPATÍA DIABÉTICA

Existen varios factores de riesgo que pueden contribuir a la disfunción cognitiva asociada a la diabetes. En la diabetes tipo 1, las evidencias halladas en los diferentes estudios sugieren que la exposición crónica a elevadas concentraciones de glucosa (hiperglucemia) y la presencia de complicaciones microvasculares (que se evidencia especialmente en la retinopatía) son los factores que más contribuyen al desarrollo de la encefalopatía. En la diabetes tipo 2, parece que la resistencia a insulina, la dislipemia, la hipertensión y la enfermedad cerebrovascular son los factores de mayor importancia en el desarrollo de la disfunción cognitiva (McCrimmon *et al.*, 2012).

2.2.1. Hiperglucemia:

Según numerosos estudios la hiperglucemia parece estar relacionada con alteraciones en la función cognitiva en pacientes diabéticos tipo 1 y 2 (Kodl & Seaquist, 2008).

La hiperglucemia altera la función de varios órganos a través de una serie de mecanismos como: la activación de la ruta poliol, el aumento de la formación de productos finales glicosados (AGEs), la activación de la proteína kinasa C (PKC) a través del diacilglicerol y el cambio de ruta de la glucosa hacia la ruta de la hexosamina (Biessels *et al.*, 2002; Brownlee, 2005; Klein & Waxman, 2003). Como consecuencia de estos mecanismos se produce un daño oxidativo (por un aumento de las especies reactivas del oxígeno, ROS), un daño vascular y una respuesta inflamatoria (mediada por NF- κ B y que también induce apoptosis) (Kuhad *et al.*, 2009). Todo ello ocurre en el cerebro y puede provocar cambios en la función cognitiva.

Klein y Waxman proponen que estos mecanismos anteriormente citados constituyen la respuesta pasiva a la hiperglucemia (Klein & Waxman, 2003). Además, también definen una respuesta activa en la cual la transcripción de los genes neuronales se modula en respuesta a la hiperglucemia y da lugar a cambios en la estructura y función neuronal, y por consiguiente, a déficits fisiológicos.

FACTORES QUE CONTRIBUYEN AL DESARROLLO DE LA DISFUNCIÓN COGNITIVA EN LA DIABETES

Los individuos con diabetes tipo 1 y tipo 2 pueden desarrollar diversas complicaciones micro y macrovasculares que contribuyen a la disfunción cognitiva, la cual puede verse agravada por una predisposición genética y por una enfermedad neuroinflamatoria del cerebro.

▪ Factores Metabólicos:

- Hiperglucemia crónica
- Hipoglucemia aguda y recurrente
- Glicación de proteínas
- Cambios en el combustible metabólico y su transporte

▪ Enfermedad Vascular

- Enfermedad microvascular
- Enfermedad macrovascular
- Disfunción endotelial
- Inflamación
- Cambios en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica
- Factores reológicos
- Dislipemia

▪ Factores endocrinos

- Reducción en la sensibilidad a la insulina
- Hiperinsulinemia
- Alteración de la regulación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal
- Aumento de la hormona antidiurética
- Hiperleptinemia

▪ Factores del Sistema Nervioso Central

- Predisposición genética
- Deposición de β -amiloide
- Cambios en la homeostasis del Calcio
- Depresión

Figura 1. Esquema de los factores de riesgo que contribuyen al desarrollo de la disfunción cognitiva en la diabetes (Modificado de McCrimmon *et al.*, 2012).

2.2.2. Hipoglucemia:

Episodios repetitivos de hipoglucemia han sido implicados como una posible causa de la disfunción cognitiva en la diabetes, aunque esta afirmación es discutible y depende de la edad de aparición de la diabetes. En estudios que datan de 1993 se observan cambios en varias regiones cerebrales como el córtex frontal y temporal, los ganglios basales y el hipocampo de pacientes diabéticos que han sufrido episodios de hipoglucemia severa (Gold *et al.*, 1993; Deary *et al.*, 1993). Sin embargo, más recientemente se han realizado meta-análisis en los que no se ha encontrado una relación entre la hipoglucemia y los resultados de los test cognitivos (Brands *et al.*, 2005). A pesar de que estudios recientes señalan que la hipoglucemia no resulta en una disfunción cognitiva, esto no se cumple para algunos grupos de alto riesgo como los niños a los que se le ha diagnosticado la diabetes en sus primeros años de vida (Aye *et al.*, 2011; Asvold *et al.*, 2010).

Sin embargo, se ha demostrado experimentalmente (en modelos animales) que tras largos periodos de hipoglucemia (30-60 minutos) se produce necrosis neuronal, aumento de aspartato, alcalemia y fallo en la energía neuronal, lo cual conlleva a un electroencefalograma plano (Auer, 2004).

2.2.3. Enfermedad vascular:

Existe una extensa literatura donde se refleja que la diabetes conlleva anomalías morfológicas y funcionales tanto en la micro como en la macrovasculatura (Pelligrino *et al.*, 1992; Johnson *et al.*, 1982; Junker *et al.*, 1985). Es lógico pensar que estos cambios vasculares sean la causa de una mayor incidencia de infarto cerebral y peores respuestas funcionales halladas en pacientes diabéticos (Mankovsky *et al.*, 1996).

La hiperglucemia reduce el flujo sanguíneo a través de una disminución de la vasodilatación (Williams *et al.*, 1998). La vasodilatación está mediada por el óxido nítrico (NO), sintetizado en las células endoteliales por la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). La hiperglucemia reduce la expresión de eNOS, probablemente por una disminución en la expresión de la PKC (Tesfamariam *et al.*, 1991) y un aumento en la actividad de la NADPH-oxidasa (Inoguchi *et al.*, 2000).

Brownlee, en su modelo teórico para explicar el daño provocado por la diabetes en diferentes tejidos (Brownlee, 2001), propone que la hiperglucemia es tóxica para las

células endoteliales de la microvasculatura del cerebro a través de dos mecanismos: en primer lugar, altera el transporte de glucosa a través de la barrera hematoencefálica; y en segundo lugar, provoca una toxicidad directa sobre las neuronas a través del aumento en la formación de radicales superóxidos (como consecuencia de un aumento del metabolismo de la glucosa intracelular). Sin embargo, Convit opina que este modelo de Brownlee no es del todo satisfactorio para explicar aquellas alteraciones asociadas a situaciones en las que no hay hiperglucemia o resistencia a la insulina. Por ello, Convit propone otro modelo en el que la disfunción endotelial no es consecuencia de la hiperglucemia y contribuye a los déficits cognitivos asociados a la diabetes cuando el aporte de glucosa al cerebro no es suficiente (Convit, 2005).

2.2.4. Resistencia a insulina:

Al contrario de lo que se creía en la década pasada acerca del papel de la insulina en el cerebro, actualmente existen evidencias a favor de que la insulina puede modular procesos cognitivos (especialmente aquellos que se dan en el hipocampo) y que además se sintetiza en el cerebro adulto (Zhao *et al.*, 1999; Gerozisis, 2003). A pesar de que la insulina no es imprescindible para la captación de glucosa por las neuronas (por la presencia de los receptores de glucosa GLUT-1 y GLUT-3, que son insulino-independientes), se sabe que hay receptores de glucosa dependientes de insulina (GLUT-4) presentes en el cerebro y especialmente en el hipocampo (Reagan, 2005; Grillo *et al.*, 2009). Además, recientemente se han descrito evidencias a favor de que la insulina es crucial para el buen funcionamiento del hipocampo (McNay & Recknagel, 2011; Duarte *et al.*, 2012).

En el cerebro, la insulina y el factor de crecimiento insulínico-1 (IGF-1) median una multitud de efectos como son: la utilización de glucosa y el metabolismo energético, el estrés oxidativo, la regulación de genes de factores de crecimiento y sus receptores, la expresión de genes colinérgicos, la expresión y la fosforilación de proteínas como tau y β amiloide, etc... (Li *et al.*, 2007; Craft, 2007; Li *et al.*, 2001; Francis *et al.*, 2008). Alteraciones en la ruta de señalización de la insulina en el cerebro y la periferia han sido implicadas en el envejecimiento, la diabetes y el Alzheimer (Frolich *et al.*, 1998; Gispen & Biessels, 2000; Hoyer, 1998; McNay & Recknagel, 2011).

El grupo de Convit propone que las alteraciones en la tolerancia a la glucosa se asocian con déficits de memoria y reducciones del volumen del hipocampo (Convit *et*

al., 2003); y que la resistencia a insulina puede estar relacionada con los déficits cognitivos (Starr & Convit, 2007). Además, se han descrito los mismos déficits neurocognitivos en pacientes con alteraciones en la tolerancia a la glucosa que en pacientes con diabetes tipo 2 (Vanhanen *et al.*, 1997).

Existen evidencias clínicas y experimentales que muestran la existencia de una conexión entre la diabetes tipo 2 y el Alzheimer. Parece que la resistencia a insulina es clave en esta conexión, ya que tiene efectos directos sobre la acumulación de β -amiloide y tau; y también tiene efectos indirectos sobre la vía apoptótica y el estrés oxidativo (Sima, 2010). Además, la alteración en la actuación de la insulina también afecta otros factores neurotróficos, neurotransmisores y proteínas estructurales del citoesqueleto neuronal. Todo ello da lugar a una degeneración de las fibras nerviosas.

2.3. ASPECTOS ESPECÍFICOS DEL HIPOCAMPO

2.3.1. Anatomía e Histología del Hipocampo:

El hipocampo es una estructura del sistema nervioso central que forma parte del sistema límbico y participa en la memoria y en la orientación espacial.

Anatómicamente, el hipocampo puede dividirse en dos regiones: hipocampo propio (o Cuerno de Ammon) y Giro Dentado (*Fascia Dentata*). El hipocampo, a su vez, forma parte de un conjunto de regiones que se agrupan por sus semejanzas citoarquitectónicas y recibe el nombre de formación hipocámpica. La formación hipocámpica comprende en total seis regiones: el hipocampo propio (Cuerno de Ammon) y el Giro Dentado; el complejo subicular (formado por el *presubiculum*, el *subiculum* y el *parasubiculum*); y la corteza entorrinal (Amaral & Witter, 1989).

El **Giro Dentado** (o *Fascia Dentata*) es una región cortical con forma de C que consta de tres capas (Insausti & Amaral, 2012). El principal tipo celular son las células granulares, que son de naturaleza glutamatérgica, tienen el soma pequeño y sus axones basales se denominan fibras musgosas. En un corte histológico, las capas que se distinguen de exterior a profundidad son (Figura 2):

- Capa Molecular (Mol): es la capa más cercana a la fisura hipocámpica, donde se localizan las prolongaciones dendríticas apicales de las neuronas granulares, algunas interneuronas y células gliales.

- Capa Granular (Gr): formada por los somas de las células granulares empaquetados densamente en columnas.

- Capa polimorfa: es la capa más profunda del Giro Dentado, también denominada *hilus*. Existe cierta controversia con respecto a la nomenclatura de esta zona, ya que algunos autores la denominan CA4 y la incluyen en el Cuerno de Amon (Lorente de Nó, 1934; Amaral, 1978). Se caracteriza por su naturaleza polimórfica, compuesta por una gran variedad de tipos celulares, entre las cuales las predominan las células musgosas (Amaral, 1978; Ribak *et al.* 1985; Amaral & Witer, 1989).

Entre la capa granular y el *hilus* se puede distinguir una fina capa, la Zona Subgranular (SGZ), compuesta por precursores neurales que poseen actividad proliferativa durante la vida adulta (Altman & Das, 1965; Kaplan & Bell, 1984; Seri *et al.*, 2001).

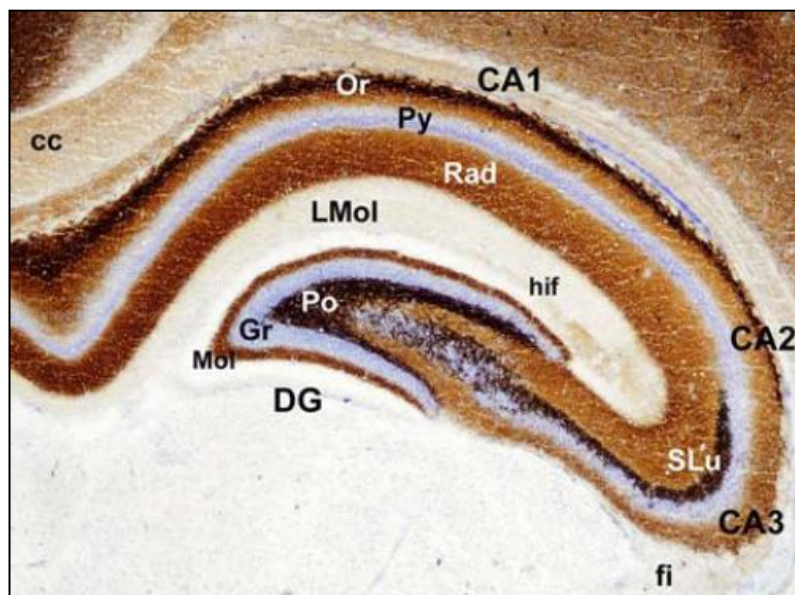


Figura 2. Microfotografía de una sección cerebral del hipocampo de ratón, teñido por la doble tinción de Timm-Nissl. En las regiones CA1-CA3 es posible identificar una serie de estratos celulares y fibrosos: *oriens* (Or), *piramidal* (Py), *radiatum* (Rad) y *lacunosum moleculare* (LMol). Únicamente, en la CA3, hay otra capa denominada *stratum lucidum* (SLu). En el Giro Dentado (DG), justo por debajo de la fisura hipocámpica (hif), vemos la capa molecular (Mol), y hacia el interior la capa de células granulares (Gr), seguida de la capa polimorfa (Po). fi, fimbria; cc, *corpúsculo callosum*. (<http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/840/1.INTRODUCCION.pdf?sequence=2>)

El hipocampo propio o **Cuerno de Ammon** está dividido en tres áreas: CA1 (la zona más distal), CA2 y CA3 (zonas más proximales) (Lorente de Nó, 1933). El principal tipo celular del Cuerno de Amón son las células piramidales, que tienen un soma voluminoso y fusiforme, y son de naturaleza glutamatérgica. Las distintas áreas están estratificadas en las siguientes capas (Figura 2):

- Estrato *alveus*: es la capa más interna, formada por los axones (de ahí su aspecto blanco) de las células piramidales.

- Estrato *oriens* (Or): capa estrecha formada esencialmente por las dendritas basales de las células piramidales.

- Estrato *piramidal* (Pyr): formado por el soma de las células piramidales.

- Estrato *lucidum* (SLu): es un estrecho estrato acelular que únicamente se distingue en el área CA3. Está formado por las dendritas apicales de las piramidales de CA3 y en el cual se establecen conexiones con las fibras musgosas procedentes del Giro Dentado.

- Estrato *radiatum* (Rad): formado por las dendritas apicales de las neuronas piramidales.

- Estrato *lacunosum-moleculare* (LMol): situado en la parte más exterior (cercana a la fisura hipocámpal), que contiene las ramificaciones más distales de las dendritas apicales de las neuronas piramidales (Amaral & Witter, 1995).

2.3.2. Circuito hipocámpal:

La información fluye a lo largo del hipocampo por medio de 3 vías principales (figura 3):

- La **vía perforante** que circula desde la corteza entorrinal a las células granulares del Giro Dentado.

- La **vía de las fibras musgosas** que va de las células granulares del Giro Dentado a las células piramidales de la región CA3 del hipocampo.

- La **vía colateral de Schaffer** donde los axones de las células piramidales de la CA3 emiten ramificaciones colaterales, llamadas ramificaciones colaterales de Schaffer, que inervan a las células piramidales de CA1.

Se ha demostrado que el hipocampo es una región fundamental para la orientación espacial, tanto en humanos como en animales (es más, contiene un tipo de neuronas de lugar que responden ante cada localización específica), y además también participa en procesos de asociación.

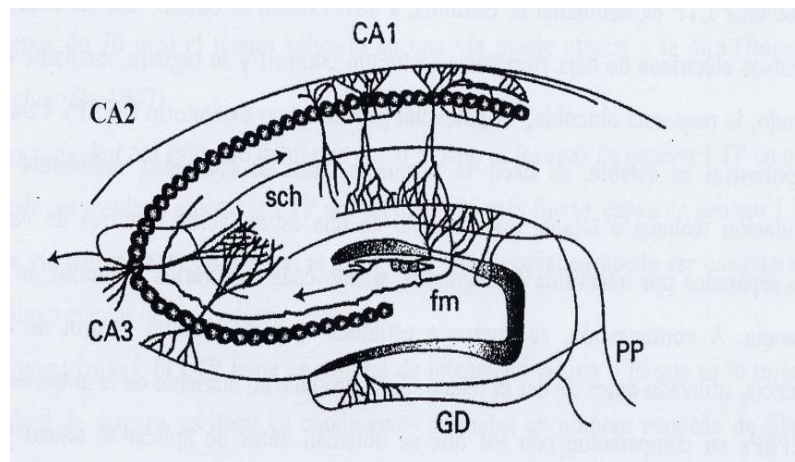


Figura 3. Diagrama básico del circuito hipocampal. PP: vía perforante; GD: giro dentado, fm: fibras musgosas, sch: fibras colaterales de Schaeffer. (O'Keefe & Lynn, 1978)

2.3.3. Hipocampo y memoria:

El hipocampo juega un papel fundamental en la memoria, ejerce una función determinante en el almacenamiento de la información nueva antes de que ésta se consolide (Squire, 1992). Una vez procesada, la información llega al hipocampo, donde se mantiene activa durante un periodo de tiempo. Durante ese tiempo, el hipocampo establece una relación bidireccional con distintas regiones del córtex, como la corteza auditiva o la visual. Estas conexiones bidireccionales son lo que constituye el proceso de consolidación de la memoria y se requieren interacciones complejas entre las diferentes zonas de procesamiento cerebral (neocorteza, lóbulo temporal medial, etc...).

La memoria se puede clasificar de acuerdo con el tiempo durante el cual es efectiva en: memoria a corto plazo y memoria a largo plazo. Además, la memoria a largo plazo también se puede dividir de acuerdo con la naturaleza de lo que se recuerda, en memoria declarativa y memoria no declarativa.

- La memoria a corto plazo o memoria de trabajo, se refiere a la capacidad para mantener los procesos el tiempo suficiente como para llevar a cabo acciones secuenciales.

- La memoria a largo plazo declarativa está compuesta por todos los datos que uno ha aprendido. El acceso a esta memoria es consciente y es dependiente de áreas cerebrales como el hipocampo (Squire, 1992).

- La memoria a largo plazo no declarativa o procedimental es probablemente la más duradera. Se trata de los hábitos, o habilidades que son aprendidos por repetición. El acceso a esta memoria es inconsciente y no requiere de la participación del hipocampo, pero sí de otras estructuras como el neocórtex, el cerebelo, la amígdala y la corteza superior (Passig *et al.*, 1996).

La memoria a corto plazo (que abarca de minutos a horas) sólo requiere modificaciones covalentes de las proteínas preexistentes; mientras que la memoria a largo plazo (que es más estable y puede durar días, semanas e incluso toda la vida) necesita crecimiento y formación de nuevas sinapsis, lo cual requiere expresión de genes y formación de nuevas proteínas (Bailey *et al.*, 1996).

2.3.4. Plasticidad sináptica: PLP y DLP

El hipocampo desempeña un papel fundamental en ciertos tipos de aprendizaje y memoria. Los cambios plásticos de la intensidad de las conexiones sinápticas están involucrados en el aprendizaje y memoria (Bliss & Collingridge, 1993; Malenka & Nicoll, 1999).

Se han descrito dos mecanismos de plasticidad sináptica:

- Potenciación a Largo Plazo (PLP ó LTP en inglés): cuando se produce una estimulación de frecuencia alta y de corta duración, sucede un incremento de la eficacia sináptica (aumento duradero de la intensidad de la transmisión sináptica) que puede durar horas o días.

- Depresión a Largo Plazo (DLP ó LTD en inglés): cuando la estimulación es de baja frecuencia y prolongada, se produce una reducción persistente de la intensidad de la sinapsis.

Ambos procesos están desencadenados por un aumento en los niveles de Ca^{2+} intracelular de las células postsinápticas (Bliss & Collingridge, 1993; Malenka & Nicoll, 1999). La PLP se desencadena por un aumento de Ca^{2+} breve e intenso; mientras que la DLP se desencadena por un aumento leve y prolongado de Ca^{2+} intracelular (Yang *et al.*, 1999).

2.3.5. Mecanismos moleculares de la memoria:

Un estímulo que desencadena memoria a corto plazo provoca el aumento de AMPc intracelular por medio de la activación de la Adenilato Ciclasa (AC). A su vez, este AMPc activa a la proteína quinasa A (PKA) la cual potencia la salida de neurotransmisores: se cierran los canales de potasio y se amplía el potencial de acción, debido a esto se da un flujo de Ca^{2+} necesario para la exocitosis de moléculas importantes para la formación de memoria (Byrne & Kandel, 1996). Con un estímulo repetitivo o prolongado se produce la memoria a largo plazo. En la memoria a largo plazo, la subunidad catalítica de la PKA activada se trasloca al núcleo y allí fosforila al factor de transcripción CREB (proteína de unión a CRE, al elemento de respuesta de AMPc), que activa genes de respuesta inmediata para dar lugar a la generación de nuevas conexiones sinápticas (Bailey *et al.*, 1996; Martin *et al.*, 1997).

El mecanismo molecular de la PLP consiste en mejorar la sensibilidad de la neurona postsináptica al neurotransmisor, y esto se consigue por el incremento en la actividad y número de receptores en la membrana postsináptica (Malenka & Bear, 2004).

Se sabe que la PLP se puede iniciar por activación de los receptores de glutamato NMDA (Morris *et al.*, 1986; Watkins & Jane, 2006) cuando se da un estímulo prolongado e intenso. El receptor NMDA, que controla la apertura de canales de Ca^{2+} , se encuentra bloqueado por iones Mg^{2+} (Malenka *et al.*, 1988) y se localiza principalmente a lo largo de la formación hipocampal. Ante un estímulo prolongado e intenso, se libera el Mg^{2+} y se produce la apertura de estos receptores NMDA cuando se une el glutamato. La apertura de los receptores NMDA supone la entrada de Ca^{2+} hacia el interior de la neurona postsináptica. La elevación del Ca^{2+} en el interior celular induce la activación de la proteína quinasa II Ca^{2+} /calmodulina (CAMKII) y de la proteína quinasa C (PKC) (Malinow *et al.*, 1989), además de inducir la activación de otras quinasas como la PKA y la quinasa reguladora de señales extracelulares (ERK).

Las quinasas CAMKII y PKC fosforilan a los receptores AMPA de glutamato, aumentando la sensibilidad al glutamato de la membrana, lo cual contribuye al mantenimiento de la PLP (Kauer *et al.*, 1988).

2.3.6. Estudios de memoria y aprendizaje:

El efecto de un tratamiento o una sustancia sobre la memoria y el aprendizaje puede ser analizado utilizando varios estudios de comportamiento. Dependiendo de la función cognitiva que se quiera estudiar o evaluar se somete al animal a uno u otro tipo de tarea o test de aprendizaje.

Entre la gran variedad de test de aprendizaje existentes los más empleados para evaluar la capacidad de memoria espacial del animal son: el laberinto de agua de Morris y los laberintos en disposición radial, en forma de T o de Y.

- Laberinto de agua de Morris: es el test más utilizado para investigar aspectos específicos de la memoria espacial. Consiste en colocar al animal en una piscina llena de agua teñida, en la que hay una plataforma escondida bajo la superficie del agua que el animal tiene que encontrar. Tras sucesivos ensayos debe aprender donde está la plataforma y nadar directamente hacia ella para escapar del agua. Las ratas sanas (control) aprenden rápidamente a localizar la plataforma, mientras aquellas con déficits de memoria necesitan más tiempo.

- Laberinto radial: en este test la ejecución de la tarea requiere memoria espacial y es sensible a la edad y a daños en el hipocampo. El animal debe explorar el ambiente que le rodea y aprender en qué brazo está localizada la comida. El laberinto en forma de T o en forma de Y son otros tipos de test similares al anterior donde también se evalúa la memoria y aprendizaje visuo-espacial. Son sensibles a los efectos de varias lesiones en el cerebro, particularmente en el hipocampo, y a numerosas sustancias o toxinas que pueden alterar la memoria espacial.

2.3.7. Mecanismos moleculares de la encefalopatía diabética:

Algunos autores defienden que los mecanismos que subyacen los déficits cognitivos en la encefalopatía diabética están relacionados con la deficiencia en insulina y, como consecuencia, con la afectación sobre la expresión de factores neurotróficos, neurotransmisores, estrés oxidativo y apoptosis. Proponen que todo ello resulta en

alteraciones de la integridad neuronal y las sinapsis que se establecen de manera habitual en el desarrollo del cerebro (Sima, 2010) (figura 4).

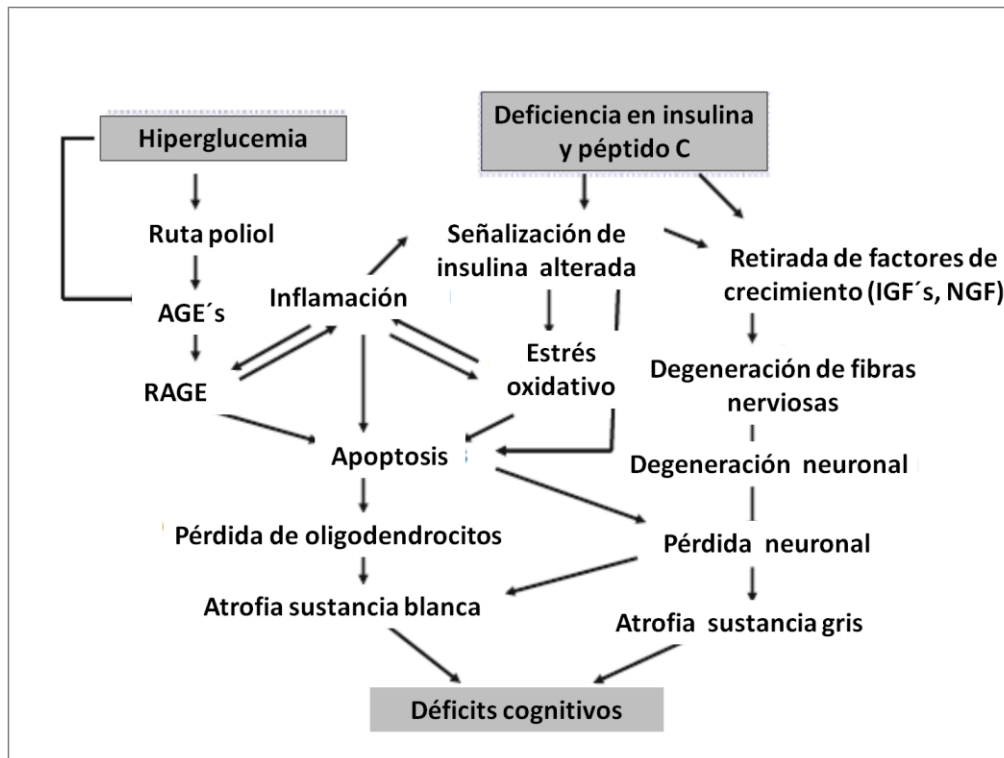


Figura 4. Mecanismos moleculares que subyacen la encefalopatía en la diabetes tipo 1. (Modificado de Sima, 2010).

Sin embargo, otros autores excluyen la diabetes tipo 1 de esta conexión entre las alteraciones en los niveles de insulina y los déficits cognitivos de la diabetes (McNay & Recknagel, 2011), apoyándose en evidencias como que existe síntesis de insulina en el cerebro (y por tanto la deficiencia periférica de insulina no debería afectar a la síntesis de insulina cerebral) y que no se han encontrado cambios en los niveles de insulina en el hipocampo de un modelo experimental de diabetes tipo 1 (Stranahan *et al.*, 2008). Estos autores proponen otros factores como posibles mecanismos que subyacen a los déficits cognitivos en la encefalopatía diabética: alteraciones vasculares, reducción del aporte de glucosa, aumento en los niveles de glucocorticoides, etc. (McNay & Recknagel, 2011). Aunque no se descarta la posibilidad de que la ruta de señalización de la insulina cerebral esté alterada en la diabetes tipo 1 ya que se han encontrado evidencias a favor de que la deficiencia periférica de insulina está acompañada de una reducción en la actividad de la señalización de insulina en el cerebro (Jolivalt *et al.*, 2008).

2.3.7.1. Apoptosis en el hipocampo diabético:

Existen evidencias experimentales de que hay apoptosis en el hipocampo diabético. La pérdida neuronal en el hipocampo se puede detectar de manera histológica, a través de marcadores de la apoptosis, o bien a través de estudios de comportamiento donde se llevan a cabo tareas de aprendizaje (Li *et al.*, 2002a). Se establece una asociación entre el déficit cognitivo (manifestado en estudios de comportamiento) y los cambios moleculares que se dan en el hipocampo diabético (especialmente en la región CA1), entre ellos: fragmentación del DNA, marcaje TUNEL positivo, aumento en la expresión de Bax y caspasa-3 (Li *et al.*, 2002a). También se ha observado una disminución de las densidades neuronales de esta región después de una diabetes prolongada en un modelo experimental de diabetes tipo 1 en ratas prediabéticas (Li *et al.*, 2002a).

El factor de crecimiento insulínico tiene un efecto neuroprotector y antiapoptótico (Russell & Feldman, 1999), por lo que al disminuir en el hipocampo diabético puede dar lugar a una pérdida neuronal. La deficiencia de insulina y de IGF-1 que se da en la diabetes contribuye de dos formas a la apoptosis (Li *et al.*, 2005): por un lado altera los factores neurotróficos y promueve los mecanismos apoptóticos relacionados con la fosfoinositol-3 quinasa (PI-3 quinasa) (Lee-Kwon *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2002b); y por otro lado mediante el estrés oxidativo derivado de la hiperglucemia (que finalmente dará lugar a apoptosis) (Schmeichel *et al.*, 2003; Srinivasan *et al.*, 2000).

El desajuste en la homeostasis del calcio neuronal que se produce por la diabetes también puede contribuir a la degeneración neuronal (Biessels *et al.*, 2002).

2.3.7.2. Función sináptica en el hipocampo diabético:

La plasticidad sináptica de las neuronas hipocampales está regulada por el complejo glutamato-receptor NMDA, que es crítico para el desarrollo de PLP y DLP. La expresión de la subunidad NR2B del receptor NMDA y su fosforilación (mediada por la CAMKII) están disminuídas en las neuronas postsinápticas hipocampales de animales diabéticos (Gardoni *et al.*, 2002; Di Luca *et al.*, 1999). Estos cambios en los receptores NMDA pueden explicar los déficits en PLP producidos por la diabetes (Di Luca *et al.*, 1999). Se han encontrado otros mecanismos que pueden explicar los déficits en PLP en el hipocampo diabético:

- Tanto el ARNm como la concentración de proteína NOS están disminuidas en las

neuronas de las regiones CA1 y CA3 del hipocampo de ratas diabéticas (Reagan & McEwen, 2002). Este hecho puede explicar, al menos de forma parcial, el déficit en la potenciación a largo plazo observada en el hipocampo diabético ya que la inducción y el mantenimiento de la potenciación dependen de la actividad NOS.

- Los cambios inducidos por la hiperglucemia sobre la homeostasis del Ca^{2+} intracelular también pueden explicar los cambios en la organización y función sináptica observados en el hipocampo diabético. En la diabetes crónica, la homeostasis de calcio neuronal sufre un desajuste progresivo que favorece el aumento de la DLP y disminuye la PLP (Kamal *et al.*, 1999).

Kamal *et al.* (Kamal *et al.*, 1999) mostraron que el nivel de inhibición GABAérgica en el hipocampo no se ve alterado por la diabetes; mientras que la sensibilidad a las acciones inhibitorias del neuromodulador adenosina sí aumenta a los pocos días o semanas desde la inducción de la diabetes (Cassar *et al.*, 1998; Morrison *et al.*, 1992).

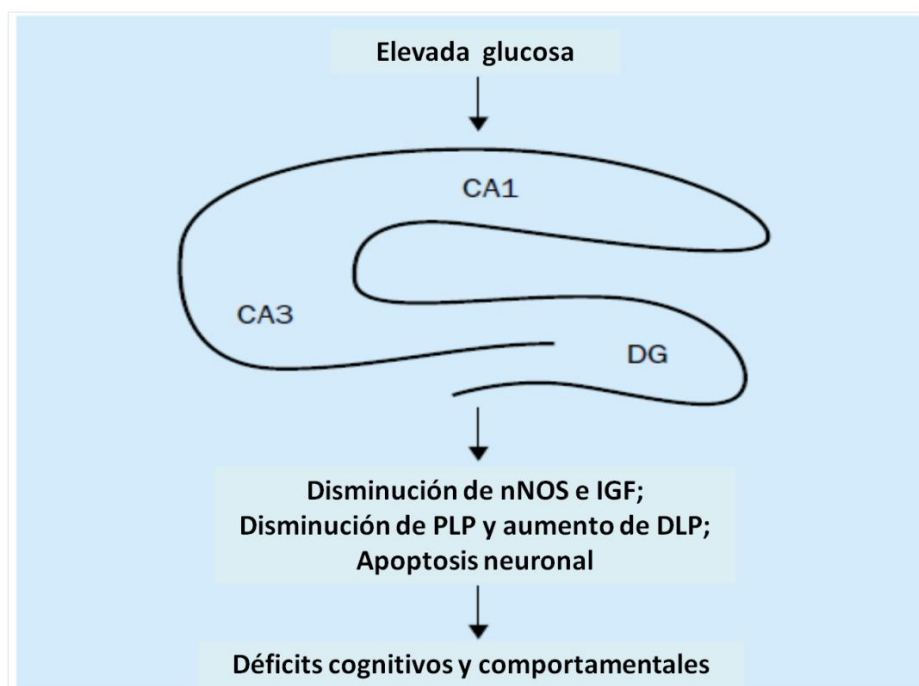


Figura 5. Mecanismos que subyacen a los déficits en la plasticidad sináptica por la diabetes. (Modificado de Klein & Waxman, 2003).

En ratas Sprague-Dawley se ha observado que después de 6-8 semanas de diabetes hay una disminución de la afinidad del glutamato por el receptor AMPA, pero no por el receptor NMDA (Gagne *et al.*, 1997). Esta reducción de la afinidad del glutamato por el

receptor AMPA se ha asociado a una disminución de la concentración de la subunidad GluR1 de dicho receptor (Gagne *et al.*, 1997).

También se ha observado en el hipocampo diabético un retraso en la velocidad de conducción de las células granulares y un aumento de la excitabilidad neuronal en las proyecciones presinápticas de la vía perforante y la vía de las fibras musgosas. Las neuronas de la región CA3 también sufren una remodelación ultraestructural: una retracción y simplificación de sus dendritas apicales y una reducción en el número de vesículas de los terminales de las fibras musgosas presinápticas (Magarinos & McEwen, 2000). Todo esto parece indicar que la diabetes afecta tanto a las estructuras pre como postsinápticas del hipocampo.

2.4. ALTERACIONES MORFOLÓGICAS Y FUNCIONALES DE LA ENCEFALOPATÍA DIABÉTICA EN EL HUMANO

Numerosos estudios en los que se emplean diversas técnicas de neuroimagen (resonancia magnética y tomografía computada) y encefalogramas, revelan cambios estructurales y funcionales en el cerebro de los pacientes diabéticos tipo 1 y 2.

En los pacientes diabéticos tipo 1, se describen varias anomalías funcionales como el aumento en las latencias de los potenciales evocados visuales (latencia de la onda P100) (Parisi & Uccioli, 2001) y la onda P300 (que indica actividad neuronal asociada a procesos de atención y memoria) (Mooradian *et al.*, 1988); reducción en la velocidad de la actividad de las ondas cerebrales (Brismar *et al.*, 2002), etc.; así como anomalías estructurales tanto en la sustancia blanca (Kodl *et al.*, 2008) como en la gris (Jongen & Biessels, 2008). Estas anomalías estructurales engloban alteraciones en la integridad de varios tractos de la sustancia blanca, hiperintensidades halladas en imágenes de resonancia (y que se corresponden con lesiones de la sustancia blanca tales como desmielinización, angionecrosis, infartos, gliosis, etc.) y reducciones del grosor cortical de la sustancia gris (Kold & Seaquist, 2008). Es probable que estas anomalías halladas en las sustancias blanca y gris expliquen la reducción en la velocidad mental tan característica de los pacientes diabéticos tipo 1.

En los pacientes diabéticos tipo 2, también se da un aumento en las latencias de los potenciales evocados (Hissa *et al.*, 2002); una disminución del flujo sanguíneo cerebral (Last *et al.*, 2007) y cambios estructurales como atrofia cerebral, lesiones en la sustancia

blanca e infartos (Kumar *et al.*, 2008; de Bresser *et al.*, 2010) que se correlacionan con la presencia de complicaciones micro y macrovasculares (Manschot *et al.*, 2007).

La atrofia hipocampal es uno de los rasgos neuroanatómicos que difiere entre los pacientes con diabetes tipo 1 o 2. Ambos tipos de diabetes dan lugar a reducciones en la densidad de la sustancia gris y lesiones de la sustancia blanca, pero se desconoce por qué el hipocampo está más afectado en la diabetes tipo 2 (Convit *et al.*, 2003), sobretodo porque esta región es más susceptible al cambio metabólico agudo que se da de manera más prominente en la diabetes tipo 1 (McCrimmon *et al.*, 2012).

2.5. DIAGNÓSTICO DE LA ENCEFALOPATÍA DIABÉTICA

Aunque se ha progresado mucho, la dificultad de detectar disfunciones neurocognitivas en pacientes diabéticos puede justificar en parte por qué la encefalopatía diabética no ha avanzado de manera similar al conocimiento que se tiene sobre el daño que causa la hiperglucemia en otros órganos.

Los test neurocognitivos, en los cuales se evalúan diferentes aspectos de la función cerebral, han sido muy útiles para valorar la cognición en diversas enfermedades, incluida la diabetes (Brands *et al.*, 2005). Sin embargo, dichos test tienen una variabilidad intrasujeto relativamente alta, lo cual reduce su habilidad para identificar déficits leves o enfermedades preclínicas. Además, los test neurocognitivos no pueden proporcionar información sobre las estructuras neurales responsables de cualquier disfunción identificada (Kodl & Seaquist, 2008).

Debido a las limitaciones de los test neurocognitivos, se están empleando también otras técnicas para evaluar la función cognitiva en los pacientes diabéticos como son:

- Potenciales evocados: que revelan de manera subclínica los déficits en la conducción nerviosa sensorial.
- Electroencefalogramas: que permiten cuantificar la actividad eléctrica cerebral.
- Resonancia magnética de imagen (MRI) y resonancia funcional (fMRI): que permiten obtener imágenes de las estructuras cerebrales, del flujo sanguíneo e incluso de la actividad del cerebro mientras se realiza una tarea (como es en el caso de la fMRI).
- Tomografía de emisión de positrones (PET): que permite detectar la ubicación y concentración de metabolitos cerebrales y neurotransmisores.

En general, cada una de las técnicas citadas tiene sus limitaciones y se han encontrado diversas contradicciones entre los resultados obtenidos al estudiar las

alteraciones funcionales, cognitivas o en la estructura de diferentes áreas del cerebro de pacientes diabéticos. A medida que las técnicas bioquímicas, electrofisiológicas y funcionales avancen, se podrán emplear para avanzar en el conocimiento de la patogénesis de la encefalopatía diabética.

2.6. TRATAMIENTO DE LA ENCEFALOPATÍA DIABÉTICA

En los últimos años, se han considerado diferentes estrategias para prevenir y tratar la encefalopatía diabética. Dado los posibles mecanismos implicados en su desarrollo, se han planteado medidas neuroprotectoras para reducir el estrés oxidativo, prevenir la apoptosis y evitar la pérdida de neuronas (Fazeli, 2009).

2.6.1. Control glucémico:

Algunos ensayos clínicos a largo plazo, como el Ensayo sobre el Control de la Diabetes y sus Complicaciones/Epidemiología de las Intervenciones de la Diabetes (DCCT/EDIC) (Jacobson *et al.*, 2011), sugieren que el deterioro cognitivo observado en pacientes diabéticos tipo 1 es probable que siga un progreso lento y leve, al menos en aquellos pacientes que tienen un buen control glucémico. Por lo tanto, proponen que el tratamiento con insulina es una buena estrategia frente a la progresión del déficit cognitivo en pacientes diabéticos tipo 1. También observaron que el control glucémico favorece la reducción de las complicaciones vasculares (Nathan *et al.*, 2005), sugiriendo que el tratamiento con insulina es beneficioso gracias a que reduce la progresión del riesgo cerebrovascular (McCrimmon *et al.*, 2012).

En el caso de la diabetes tipo 2, el papel del control glucémico sobre el deterioro cognitivo es incierto. Existe cierta controversia en los resultados obtenidos en diferentes ensayos clínicos: mientras algunos ensayos muestran que no existe mejora sobre la función cognitiva de los pacientes cuando se da un tratamiento para normalizar la glucemia (Launer *et al.*, 2011), otros señalan que la normalización de la glucemia (expresado como una reducción de la hemoglobina glicosilada, HbA1c) se asocia con una disminución del riesgo de sufrir infarto (Wilcox *et al.*, 2007).

2.6.2. Antioxidantes:

Existe un gran abanico de estudios en los que se han descrito los efectos de constituyentes de plantas sobre los déficits cognitivos asociados a la diabetes. Dichos constituyentes, como el guggulipid (Saxena *et al.*, 2007), la curcumina (Kuhad &

Chopra, 2007), el sesamol (Kuhad & Chopra, 2008), el licopeno (Kuhad *et al.*, 2008), el resveratrol (Schmatz *et al.*, 2009) y el ginsenosido Re (Liu *et al.*, 2012b) tienen efectos antioxidantes y antiinflamatorios.

2.6.3. Hormonas:

Saravia *et al.* mostraron experimentalmente que el estradiol (administrado como un implante) restauraba la neurogénesis en el Giro Dentado de ratones diabéticos (Saravia *et al.*, 2006).

Hay varios estudios que muestran el papel del péptido C (que es una parte de la molécula de proinsulina que se escinde de ella) en la prevención de la apoptosis de neuronas hipocampales y los déficits cognitivos (Grunberger *et al.*, 2001; Sima & Wahren, 2009).

2.6.4. Fármacos:

En los últimos años, se han propuesto algunos fármacos con propiedades neuroprotectoras para la mejora de los déficits cognitivos asociados a la diabetes. Beauquis *et al.* demostraron que la fluoxetina (un inhibidor de la recaptación de serotonina) aumentaba la proliferación neuronal en el Giro Dentado de ratones diabéticos (Beauquis *et al.*, 2006).

El tratamiento con nifedipina (agente bloqueante de los canales de calcio) mejora la función cognitiva en ratones diabéticos a través de la reducción en la producción del anión superóxido, la disminución de la hiperinsulinemia y el aumento en la expresión de un gen que controla la diferenciación neuronal (Tsukuda *et al.*, 2008).

Otro componente que se está estudiando en ensayos clínicos es la suplementación con acetil-l-carnitina (ALC), que aumenta la producción de acetilcolina. ALC actúa sobre el metabolismo oxidativo y el aumento de ATP, mejorando el estrés oxidativo, inhibiendo la excitotoxicidad hipocampal y aumentando la respuesta al factor de crecimiento neurotrófico (NGF). Se ha demostrado que la administración de ALC a pacientes con Alzheimer mejora la memoria a largo plazo, el aprendizaje espacial y el reconocimiento de personas (Zanelli *et al.*, 2005).

3. PAPEL DE LA NEUROGÉNESIS EN LA ENCEFALOPATÍA DIABÉTICA

3.1. DEFINICIÓN DE NEUROGÉNESIS

La neurogénesis en el adulto es la producción de nuevas neuronas en el cerebro adulto. Este término comprende un proceso complejo que comienza con la proliferación de las células progenitoras, continúa con la determinación al fenotipo neural, la maduración morfológica y fisiológica, el desarrollo de las características funcionales de neurona y finaliza con la existencia de una nueva neurona funcional e integrada (Balu & Lucki, 2009).

Hasta la segunda mitad del siglo XX se pensaba que el cerebro adulto era incapaz de generar o añadir nuevas neuronas al complejo circuito existente, de hecho, uno de los dogmas de la neurociencia era que el cerebro adulto era fijo e inmutable. Hoy en día se sabe que tanto las neuronas como las células gliales se siguen produciendo por la diferenciación de células madre durante toda la vida de los seres vivos (Kuhn *et al.*, 1996).

La primera evidencia de neurogénesis la describió Ezra Allen (Allen, 1912) cuando encontró células mitóticas en el cerebro de crías de ratas. Hasta los años 1960 no apareció la siguiente evidencia de producción de nuevas neuronas en el Giro Dentado del hipocampo de ratas adultas (Altman, 1963; Altman & Das, 1965). A lo largo de los 20 años siguientes, fueron apareciendo más evidencias a favor de la neurogénesis en el cerebro adulto (Kaplan & Hinds, 1977; Goldman & Nottebohm, 1983; Gould *et al.*, 1992), pero la comunidad científica no lo aceptaba porque no parecía haber pruebas suficientes de que esas células proliferativas eran neuronas. Fue a principio de los 90, cuando se describió la técnica de BrdU, que permitía marcar células activas mitóticamente y además se podía combinar con marcadores neuronales para identificar el fenotipo de las células mitóticas. Ya a finales del siglo XX, se describió la neurogénesis en adulto en un gran número de especies de mamíferos (Doetsch *et al.*, 1997 ; Gould *et al.*, 1998; Kornack & Rakic, 2001), y en el ser humano (Eriksson *et al.*, 1998), y ganó aceptación en la comunidad científica.

En humanos la generación de nuevas neuronas se ha constatado y descrito en diferentes zonas del sistema nervioso: el bulbo olfatorio, el hipocampo y en diferentes

áreas de la corteza cerebral (Kempermann *et al.*, 1998; Lledo *et al.*, 2006). También se ha descrito esta neurogénesis en la región prefrontal, en la región temporal inferior, y en la región parietal posterior.

3.2. TÉCNICA DE MEDIDA DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR: BrdU

La primera evidencia de neurogénesis en cerebro adulto fue llevada a cabo en roedores en el año 1960, empleando la técnica autorradiografía con timidina tritiada (Altman, 1969). En las décadas posteriores surgieron nuevas técnicas y protocolos para el estudio *in situ* de la proliferación. Estas nuevas técnicas *in situ*, y concretamente la del marcaje con bromodeoxiuridina, ayudaron a confirmar el hecho de que la neurogénesis ocurre en el cerebro adulto. El marcaje con bromodeoxiuridina es actualmente el método más común empleado para el estudio de la neurogénesis. Sin embargo, este procedimiento tiene sus limitaciones y controversias (Taupin, 2007).

La bromodeoxiuridina (5-bromo-2-deoxiuridina, BrdU) es un nucleótido sintético análogo de la timidina. La técnica de BrdU es comúnmente utilizada en la detección de células en división en tejidos vivos ya que la BrdU puede incorporarse a la nueva síntesis de ADN durante la fase S del ciclo celular, sustituyendo a la timidina durante la replicación del ADN. Debido al hecho de que la BrdU puede reemplazar la timidina durante la replicación del ADN, puede causar mutaciones, y por lo tanto su uso no es seguro para la salud, por lo que sólo se usa en animales de experimentación.

El marcaje con BrdU se puede emplear para estudiar la proliferación, si la inyección a los animales es horas antes a su sacrificio, o para el estudio de la supervivencia, si la inyección es varios días antes del sacrificio de los animales.

3.3. NEUROGÉNESIS EN HIPOCAMPO

La neurogénesis en hipocampo se ha descrito *in vivo* en roedores adultos (Altman, 1969), monos (Gould *et al.*, 1998) y en humanos (Eriksson *et al.*, 1998).

Las células recién producidas destinadas a convertirse en neuronas se generan en la zona que subyace a la capa granular, lo que se conoce como la zona subgranular (SGZ) del Giro Dentado. Las células migran una corta distancia hasta la capa granular, extienden sus dendritas hasta la capa molecular del hipocampo, y envían sus axones

hasta la región CA3 (Stanfield & Trice, 1988; Hastings & Gould, 1999; Markakis & Gage, 1999) donde desarrollan propiedades electrofisiológicas (van Praag *et al.*, 2002).

La identidad de las células precursoras de neuronas de la SGZ ha sido descrita por Seri *et al.* (Seri *et al.*, 2001; Seri *et al.*, 2004), donde se identifican como astrocitos.

Las neuronas generadas en el hipocampo adulto presentan una forma de plasticidad estructural que puede ser regulada por el entorno, y también se sugiere que la neurogénesis desempeña un papel importante en la función del hipocampo (Gould *et al.*, 2000).

3.4. NEUROGÉNESIS Y DIABETES

Existen numerosos estudios en los que se observa que la neurogénesis adulta en hipocampo está alterada en modelos experimentales de diabetes (Zhang *et al.*, 2008; Beauquis *et al.*, 2006; Stranahan *et al.*, 2008).

En modelos experimentales de diabetes tipo 1, en los que se mostraba una reducción en la proliferación y supervivencia neuronal en el hipocampo de ratones adultos, el tratamiento con estrógenos (Saravia *et al.*, 2004) y fluoxetina (inhibidor de la recaptación de serotonina) (Beauquis *et al.*, 2006) previno esta reducción.

En el caso de la diabetes tipo 2, se han observado alteraciones en la PLP del Giro Dentado y déficits en el aprendizaje en el laberinto de agua de Morris (Stranahan *et al.*, 2008). Estos déficits en la plasticidad sináptica hipocampal y en la memoria se asociaron a un aumento en los niveles de corticosterona, junto con alteraciones en la proliferación y supervivencia neuronal en el hipocampo. Cuando la concentración de corticosterona se mantuvo en valores fisiológicos normales, los cambios en la plasticidad sináptica y en la función del hipocampo de los modelos experimentales se revirtieron. Estas evidencias sugieren que los déficits cognitivos asociados a la diabetes pueden ser provocados por déficits en neurogénesis y plasticidad sináptica mediados por una alteración en las concentraciones de glucocorticoides (Stranahan *et al.*, 2008).

El déficit en la neurogénesis causado por hiperglucemia puede proporcionar una explicación frente a los déficits de memoria observados en algunos pacientes diabéticos (Zhang *et al.*, 2008). Esta hipótesis ha sido propuesta por otros autores como Jackson-Guilford *et al.* (Jackson-Guilford *et al.*, 2000).

4. FISIOLÓGÍA DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA ENCEFALOPATÍA DIABÉTICA

4.1. ESTRÉS OXIDATIVO. RADICALES LIBRES

4.1.1. Generación de radicales libres:

Los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno (ROS) proceden de fuentes metabólicas endógenas o de agresiones oxidativas externas.

Dentro de las fuentes endógenas de producción de radicales libres podemos incluir las siguientes:

- La cadena electrónica mitocondrial (Kas & Blattna, 1986).
- Excesiva actividad de la NADPH fagocitaria (Gabig & Babior, 1979).
- Activación del metabolismo del ácido araquidónico en procesos inflamatorios (Winyard *et al.*, 1994).
- Deslocalización de metales de transición (Fe^{2+} y Cu^{+}) de sus sitios de depósito (Halliwell & Gutteridge, 1986).
- Hiperactividad de la xantina oxidasa (Chambers *et al.*, 1985).
- Activación de la enzima óxido nítrico sintasa (Beckman *et al.*, 1990).
- Menor capacidad de los mecanismos protectores antioxidantes (Giugliano *et al.*, 1996).

Algunas de las fuentes exógenas de daño oxidativo son:

- Radiaciones ionizantes (Fridovich, 1983).
- Aumento en la disponibilidad de metales de transición en algunas enfermedades metabólicas y en procesos inflamatorios (Halliwell & Gutteridge, 1986).
- Acción de xenobióticos y fármacos (Trush *et al.*, 1982).
- Exceso en la concentración de oxígeno o los procesos en los que hay fenómenos de isquemia-reperfusión (McCord & Roy, 1982).

4.1.2. Papel fisiológico y patológico:

En cuanto al papel fisiológico, se ha demostrado la función de los radicales libres en la defensa antimicrobiana y antitumoral, también como mensajeros e inductores

genéticos (Hardy & Hunt, 2004; Satriano *et al.*, 1993; Zimmerman *et al.*, 2002). Pueden intervenir en la inactivación o activación de ciertas enzimas (Fillebeen & Pantopoulos, 2002; Sindhu *et al.*, 2005) y contribuir a la regulación de la extensión del proceso inflamatorio (Bourbon *et al.*, 2004). Además, se ha postulado que el balance oxidante-antioxidante puede intervenir en el proceso de la apoptosis (Buttke & Sandstrom, 1994; Svensk *et al.*, 2004). Algunos radicales libres también intervienen en los procesos de memoria y aprendizaje, ya que se ha descrito que son necesarios para la generación de una adecuada potenciación a largo plazo (PLP) (Klann, 1998). De hecho, cuando el receptor de NMDA se activa, proceso que se produce durante la PLP, aumenta la cantidad de superóxido (Bindokas *et al.*, 1996). Sin embargo, otros autores indican que la inducción de estrés oxidativo puede causar daños en la memoria y el aprendizaje (Farooqui, 2008).

Respecto a su papel patológico, los radicales libres pueden relacionarse con la hipertensión (Touyz, 2004), la disfunción cardiovascular (Ramachandran *et al.*, 2003), la inflamación (Telfer & Brock, 2004) y con enfermedades como la diabetes (Hermenegildo *et al.*, 1993; Miranda *et al.*, 2006; Muriach *et al.*, 2006), el SIDA (Hsu *et al.*, 2003), la epilepsia (Patel, 2004), etc.

Estos radicales pueden alterar directa o indirectamente varios mecanismos celulares y fisiológicos, por medio de los cuales pueden producir en último término apoptosis y muerte neuronal (Li *et al.*, 2002a; Paravicini & Touyz, 2008; Svensk *et al.*, 2004; Gupta *et al.*, 2007; Torchinsky & Toder, 2007). Pueden inducir alteraciones de macromoléculas vitales para los seres vivos, entre ellas el ADN (provocando mutaciones), los lípidos de membrana (provocando su peroxidación) o las proteínas (alterando actividades enzimáticas).

4.2. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

La peroxidación lipídica consiste en el deterioro oxidativo (dependiente de oxígeno) de grasas, y sobre todo de los ácidos grasos insaturados. Ocurre cuando el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) es generado en la proximidad de las membranas y ataca a los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos, como el ácido araquidónico.

Un $\cdot\text{OH}$ puede convertir cientos de ácidos grasos de la membrana en lípidos hidroperoxidados, que son muy inestables y rápidamente se descomponen en otros productos, pudiéndose producir nuevos radicales libres que pueden a su vez iniciar nuevas cadenas de peroxidación.

La peroxidación de lípidos es un fenómeno que puede conducir a la muerte celular, pero también puede inducir la formación de intermediarios derivados de los lípidos. Entre los productos de la peroxidación lipídica se incluyen una serie de aldehídos que actúan como “mensajeros tóxicos secundarios”, modificando la acción de los radicales libres iniciales, ya que, al contrario que éstos, poseen una vida media mucho mayor y pueden por tanto difundir desde su lugar de producción, alcanzando células o tejidos situados a cierta distancia.

Entre los diferentes aldehídos que se producen en la peroxidación de lípidos, los más estudiados han sido el Malondialdehído (MDA) y los 4-hidroxiálquenos. A continuación describiremos brevemente el MDA, puesto que es objeto de estudio de este trabajo.

4.2.1. Malondialdehído (MDA):

El MDA es una molécula volátil, de bajo peso molecular y tiene un grupo carbonilo que le da un carácter ligeramente ácido. Resulta de la degradación oxidativa de los ácidos grasos poliinsaturados.

Dado que el MDA es un producto final común de la peroxidación lipídica, independientemente del ácido graso poliinsaturado oxidado, su determinación ha sido ampliamente aceptada como marcador del proceso de peroxidación lipídica (Romero *et al.*, 1998; Halliwell, 2000; Piconi *et al.*, 2003; Cojocar *et al.*, 2004).

4.3. DEFENSA ANTIOXIDANTE

4.3.1. Sistemas antioxidantes de importancia biológica:

Un antioxidante se define como cualquier sustancia que, cuando está presente a concentraciones bajas en comparación con las del sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de dicho sustrato (Halliwell & Gutteridge, 1986). El término “sustrato oxidable” incluye casi todas las macromoléculas que se encuentran en

las células vivas, como proteínas, lípidos, carbohidratos y ADN. La desintoxicación de las especies reactivas del oxígeno es uno de los requisitos para la vida aerobia, por lo que se ha desarrollado un importante sistema defensivo antioxidante formado por:

- Recolectores y neutralizadores no enzimáticos que se llaman antioxidantes, proporcionados o no por la dieta, como son las vitaminas C y E, glutatión, etc.
- Enzimas con actividad antioxidante directa o primaria, llamadas así por inactivar directamente especies activadas de oxígeno (catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, etc.).
- Enzimas con actividad antioxidante secundaria, que contribuyen al mantenimiento de otros sistemas antioxidantes o bien conjugan sustancias derivadas de la acción tóxica de los radicales (glutatión S-transferasa, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, etc.) (Sies & de Groot, 1992).

4.3.2. El sistema glutatión:

Se denomina sistema glutatión al conjunto formado por el glutatión (GSH) y las enzimas relacionados con su metabolismo, que son además responsables del mantenimiento de su estado redox en condiciones fisiológicas (Meister & Anderson, 1983).

El glutatión es un tripéptido (constituido por ácido glutámico, cisteína y glicina) de interesantes propiedades biológicas debido a dos características estructurales: el enlace γ -glutamilo que lo protege de las peptidasas, y la presencia de un grupo tiol libre (-SH) que lo convierte en un compuesto muy reactivo con todo tipo de sustancias e incluso consigo mismo (Meister & Anderson, 1983). Es el tiol no proteico más abundante de prácticamente todas las células animales (Dringen, 2000) y su presencia se puede explicar por su función protectora frente a la toxicidad del oxígeno (Fahey *et al.*, 1987).

Se considera que el estado del glutatión es el equilibrio entre las distintas formas en las que este tripéptido se puede presentar (Kosower & Kosower, 1978). Podemos encontrarlo en forma de tiol reducido (GSH), en forma oxidada (GSSG) y en forma de disulfuros mixtos, en su mayoría GS-S-proteína.

El glutatión está relacionado con la actividad de algunas enzimas como la glutatión peroxidasa (GPx), la glutatión transferasa, la glutatión reductasa y la γ -glutamilo

transpeptidasa. Estas enzimas participan en la síntesis y en el mantenimiento del estado del glutatión.

Además del glutatión existe una gran batería de compuestos biológicos encargados del mantenimiento del equilibrio redox en el organismo. Entre ellos destacan la vitamina E (tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico) y el ácido lipoico. Otros como la ubiquinona y los carotenoides tienen variado interés dependiendo del medio en cuestión.

4.4. ESTRÉS OXIDATIVO Y DIABETES

Se cree que el estrés oxidativo es uno de los principales factores de riesgo en la aparición y el progreso de la diabetes. Muchos de los factores de riesgo de la diabetes como la obesidad, la edad avanzada, una dieta no saludable, etc... contribuyen a un ambiente oxidativo y pueden alterar la sensibilidad de los tejidos a la insulina a través del aumento de la resistencia a insulina o bien alterando la tolerancia a la glucosa. Los mecanismos implicados en la resistencia a insulina son múltiples y complejos, e implican varias rutas de señalización celular como la del factor nuclear kappa B (NF- κ B), proteínas quinasas activadas por estrés (SAPK)/Jun amino terminal quinasas (JNK) y proteínas quinasas activadas por mitógeno p38 (p38 MAPK) (Rains & Jain, 2011).

En la literatura existen numerosos estudios clínicos y experimentales que indican que los sujetos diabéticos tienen mayores niveles de ROS y marcadores de estrés oxidativo, y una disminución de las defensas antioxidantes que los sujetos normales (Bloch-Damti & Bashan, 2005; Berr *et al.*, 2000; Jain, 1989; Miranda *et al.*, 2004; Miranda *et al.*, 2007; Muriach *et al.*, 2006; Arnal *et al.*, 2009).

La hiperglucemia, que es un elemento común en la diabetes tipo 1 y 2, es uno de los principales factores que contribuyen al estrés oxidativo; y lo hace directamente a través de la producción de ROS o bien de forma indirecta, alterando el equilibrio redox. Existen diversas vías y mecanismos por los que la hiperglucemia conduce al estrés oxidativo: disminución de los niveles de antioxidantes, síntesis de prostanoides, vía poliol, autooxidación de la glucosa, glicosilación proteica, interacciones de los productos finales de glicación no enzimática (AGE) con sus receptores (RAGE) y producción de radicales libres como el anión superóxido. Todos estos mecanismos están relacionados entre sí.

- Vía poliol: la vía poliol es activada durante la hiperglucemia y da lugar al consumo de NADPH y al agotamiento del glutatión, lo cual facilita que ocurra el daño oxidativo intracelular (porque agota las defensas antioxidantes).
- Formación de productos de glicación no enzimática (AGEs): El aumento en la formación de productos de glicación no enzimática perjudica a las células porque modifica la estructura y función de proteínas intracelulares y algunos componentes de la matriz. Además, las proteínas plasmáticas modificadas se unen a receptores RAGE (Brownlee, 2001), presentes en células endoteliales, microglía, macrófagos, etc... y producen ROS. La unión AGE con su receptor también activa la transcripción de NF- κ B, dando lugar a la expresión de moléculas proinflamatorias (Schmidt *et al.*, 1999; Kuhad *et al.*, 2009).

La glicación no enzimática también se da en las enzimas antioxidantes, por lo que afecta a los mecanismos de defensa de la célula, favoreciendo el estrés oxidativo y la progresión de las complicaciones de la diabetes (Rains & Jain, 2011).

- Activación de la proteína quinasa C: durante la hiperglucemia, se da una activación de la proteína quinasa C (PKC) mediada por diacilglicerol que puede contribuir de forma directa e indirecta a la producción de ROS.
- Producción de anión superóxido: elevados niveles de glucosa alcanzan la mitocondria y dan lugar a una sobreestimulación de la cadena de transporte electrónico, resultando en una sobreproducción de anión superóxido (Brownlee, 2001).

Se plantea la duda de si la presencia de un mayor estrés oxidativo es consecuencia de las complicaciones de la diabetes o si por el contrario, es causa de las mismas. En la última década se han orientado los esfuerzos en investigación para dilucidar esta cuestión y parecen apuntar a que el estrés oxidativo ocurre antes de la aparición de las complicaciones de la diabetes y que la terapia antioxidante no sólo disminuye los indicadores de estrés oxidativo sino que también disminuye las complicaciones de la diabetes (Santiago *et al.*, 2007; Kowluru & Odenbach, 2004; Chucair *et al.*, 2007; Muriach *et al.*, 2006; Miranda *et al.*, 2007).

4.4.1. Estrés oxidativo y encefalopatía diabética:

El tejido nervioso presenta un elevado consumo de oxígeno y un gran contenido en sustratos fácilmente oxidables (fundamentalmente ácidos grasos poliinsaturados), por lo que es especialmente susceptible al ataque por agentes oxidantes como los radicales libres derivados del oxígeno (Nordmann, 1994). Además, se sabe que la utilización de la glucosa está alterada en el cerebro de pacientes diabéticos. Al ser la glucosa la principal fuente de energía del cerebro, estos trastornos dan lugar a alteraciones en el metabolismo energético de las neuronas que a su vez inducen la formación de radicales libres con el consecuente daño neuronal (Vajda, 2002).

Diversos autores sugieren que el estrés oxidativo está implicado en la patogénesis de las complicaciones tardías de la diabetes (Mohamed *et al.*, 1999) y que el daño oxidativo en diversas regiones cerebrales da lugar a anomalías morfológicas y alteraciones de la memoria (Fukui *et al.*, 2001). Se ha mostrado que un aumento de estrés oxidativo y/o una deficiencia de los agentes antioxidantes puede dar lugar a un déficit cognitivo (Berr *et al.*, 2000).

Existen muchas evidencias experimentales de que el aumento del estrés oxidativo en la diabetes produce daño oxidativo en varias regiones del cerebro de rata, incluido el hipocampo (Reagan, 2002; Aragno *et al.*, 2002; Grillo *et al.*, 2003), que es más sensible al estrés oxidativo que otras partes del cerebro (Reagan *et al.*, 2000). La diabetes induce un incremento en los productos de peroxidación lipídica, como el HNE o el MDA (Muriach *et al.*, 2006; Alvarez-Nölting *et al.*, 2011) y un descenso de la defensa antioxidante como el GSH, las enzimas catalasa o superóxido dismutasa (Uluslu *et al.*, 2003). Todo ello está acompañado de una disfunción cognitiva (Kuhad & Chopra, 2008; Saxena *et al.*, 2007). Los ROS producidos como consecuencia de la hiperglucemia pueden estimular la producción de citoquinas proinflamatorias y la expresión de NF- κ B, que se asocian a los déficits cognitivos de la diabetes (Kuhad *et al.*, 2009).

4.4.2. Estrés oxidativo y neurogénesis:

Como ya se ha mencionado anteriormente, se sabe que el daño oxidativo subyace el deterioro neuronal en el sistema nervioso central como consecuencia de la diabetes. También se ha mencionado que la hiperglucemia, debida a la diabetes mellitus, provoca

estrés oxidativo en el sistema nervioso central y que el estrés oxidativo desempeña una función importante en la patogénesis de los cambios neurodegenerativos (Ates *et al.*, 2006). Hay evidencias que sugieren que la falta de insulina o la hiperglucemia pueden ser factores que contribuyan a la reducción de la neurogénesis en la diabetes (Zhang *et al.*, 2008).

Existen evidencias experimentales de una reducción en la proliferación y supervivencia neuronal en el hipocampo en modelos animales de diabetes tipo 1 (Saravia *et al.*, 2004; Beauquis *et al.*, 2006; Jackson-Guilford *et al.*, 2000) y tipo 2 (Stranahan *et al.*, 2008). Estos déficits en la neurogénesis hipocampal, junto con las alteraciones en la plasticidad sináptica, pueden subyacer a los cambios que se dan en la función del hipocampo y por tanto a los déficits cognitivos asociados a la diabetes (Zhang *et al.*, 2008).

5. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN Y SU IMPLICACIÓN EN LA ENCEFALOPATÍA DIABÉTICA

5.1. FACTOR NUCLEAR KAPPA B (NF-κB)

5.1.1. Definición y funciones:

El Factor Nuclear kappa B (NF-κB) es un factor de transcripción que pertenece a una familia compuesta por cinco miembros: p50 (producto de la proteína NFκB1 o p105), p52 (producto de la proteína NFκB2 o p100), p65 (también conocido como RelA), c-Rel y RelB. Para ser transcripcionalmente activo, debe ser un dímero y por ello los miembros se combinan para dar lugar a homodímeros o heterodímeros. Los dímeros de NF-κB existen de forma latente en el citoplasma unidos a la proteína inhibitoria IκB (Malek *et al.*, 2001). Se han identificado siete miembros que componen la familia IκB: IκBα, IκBβ, IκBε, IκBγ, IκBζ, Bcl-3, y los precursores de p50 y p52, p105 y p100, respectivamente (Malek *et al.*, 2001). Las proteínas inhibitorias IκB enmascaran los dominios de localización nuclear y de unión al ADN de NF-κB (Baeuerle & Henkel, 1994), y por tanto previenen su translocación al núcleo. La actividad de las IκBs está controlada por una cascada de fosforilación, a través de IκB quinazas (IKKs). Aquellas señales que promueven la actividad de NF-κB provocan la fosforilación, disociación y

degradación de la I κ B a la que está unido, y finalmente la liberación de NF- κ B, que se trasloca al núcleo y se une a las secuencias κ B del ADN para inducir la expresión de determinados genes.

NF- κ B es activado por varios estímulos como endotoxinas bacterianas, citoquinas inflamatorias, hipoxia, hiperglucemia, etc... (Baldwin, 1996) y desempeña un papel fundamental en la regulación de respuestas inflamatorias, inmunitarias y al estrés.

Las especies reactivas de oxígeno también están involucradas en la activación de este factor de transcripción (Schmidt *et al.*, 1995) y además se ha observado que la activación de NF- κ B induce una variedad de genes implicados en respuesta a estrés oxidativo (Schreck *et al.*, 1992).

El factor de transcripción NF- κ B también participa en el proceso de muerte celular programada, teniendo efectos tanto pro-apoptóticos como anti-apoptóticos (Barkett & Gilmore, 1999; Middleton *et al.*, 2000; Fridmacher *et al.*, 2003; Blondeau *et al.*, 2001; Brambilla *et al.*, 2005). Se sabe que el efecto pro o anti-apoptótico depende del tipo y duración del estímulo, así como del tipo de célula (Clemens *et al.*, 1997).

También se sabe que NF- κ B participa en la regulación de la transmisión sináptica y por tanto en la plasticidad sináptica. De hecho, NF- κ B puede regular (negativamente o positivamente) la expresión de genes que gobiernan cambios en la plasticidad sináptica y en las funciones cognitivas (West *et al.*, 2002). Además, se ha descrito que algunas subunidades de NF- κ B están involucradas en la neurogénesis (Denis-Donini *et al.*, 2008).

5.1.2. NF- κ B y diabetes:

La diabetes da lugar a la activación de NF- κ B, ya sea como respuesta a la alteración en la señalización de la glucosa (Pierson *et al.*, 2002; Xu & Sima, 2001) o por la unión de los productos de glicación no enzimática a sus receptores (unión AGEs-RAGE) (Schmidt *et al.*, 1999; Kuhad *et al.*, 2009). NF- κ B desempeña un papel fundamental en la iniciación de la cascada inflamatoria, a través de la activación del factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleuquinas y la proteína C reactiva (Yerneni *et al.*, 1999; Luppi *et al.*, 2008; Sima *et al.*, 2009a). El aumento de la expresión de TNF- α tiene un efecto

inhibitorio sobre la señalización de la insulina y del IGF-1, provocando una respuesta de retroalimentación positiva (Sima *et al.*, 2009a).

La activación de NF- κ B por la hiperglucemia también induce apoptosis en neuronas (Mastrocola *et al.*, 2005; Somfai *et al.*, 2006). Kuhad *et al.* han establecido una relación entre la activación de NF- κ B y los déficits cognitivos asociados a la diabetes (Kuhad *et al.*, 2009).

5.2. PROTEÍNA DE UNIÓN AL ELEMENTO DE RESPUESTA DE AMPc (CREB)

5.2.1. Definición y funciones:

La proteína de unión al elemento de respuesta de AMPc (CREB) pertenece a una familia de factores de transcripción que está englobada a su vez en la superfamilia de factores que contiene un cierre de leucinas (secuencia repetitiva de residuos de leucina que da al factor de transcripción una conformación estructural orientada de forma paralela al ADN, para facilitar su unión). CREB se une en forma de dímero a una región específica del ADN, al elemento de respuesta del AMPc (CRE), que se localiza en los promotores de numerosos genes, regulando su expresión. CREB es un mediador entre la señalización molecular de los estímulos externos (factores de crecimiento y agentes extracelulares) y la expresión de determinados genes con su consecuente respuesta en las células u órganos diana (Shaywitz & Greenberg, 1999) y está implicado en numerosas rutas de señalización intracelular.

Cuando la célula recibe una señal, se estimula la cascada de señalización intracelular y se fosforilan ambos miembros del dímero de CREB, que inician su actividad transcripcional (Mayr & Montminy, 2001). CREB es activo cuando se fosforila en la serina 133 por la proteína quinasa A (PKA) dependiente de AMPc, y se convierte en fosfo-CREB (pCREB), que tiene mayor afinidad por el ADN y así lleva a cabo la transcripción de los genes. CREB es también fosforilado en esta misma serina por otras quinasas como la calmodulina dependiente de Ca^{2+} IV (CaMIV) y la quinasa dependiente de señales extracelulares (ERK) (Kasahara *et al.*, 2001).

Esta proteína también está implicada en la activación de la síntesis de proteínas necesarias para la formación de memoria a largo plazo (Ishige *et al.*, 1999; Lamprecht

& Dudai, 1996; Lamprecht *et al.*, 1997). La supresión de la actividad de CREB a través de oligonucleótidos antisentido (Guzowski & McGaugh, 1997) o *knock out* genéticos (Bourtchuladze *et al.*, 1994) altera la formación de memoria a largo plazo; mientras que la sobreexpresión de CREB puede aumentar dicho tipo de memoria (Josselyn *et al.*, 2001). Además, CREB regula la transcripción de GABAA1, un subtipo de receptor del neurotransmisor ácido gamma-aminobutírico (GABA) que participa en la excitabilidad neuronal y en la modulación de la neurotransmisión sináptica (Lujan, 2007).

La interrupción de la ruta de fosforilación de CREB perjudica algunas habilidades cognitivas y aspectos del comportamiento asociados con el sistema nervioso central. Se han relacionado las alteraciones en la transcripción de genes mediada por CREB con múltiples desórdenes psiquiátricos como la depresión, ansiedad, adicción y déficits cognitivos (Mayr & Montminy, 2001).

5.2.2. CREB y diabetes:

Como ya se ha mencionado anteriormente, la interacción entre los AGES y sus receptores (RAGEs) estimula diversas cascadas de señalización, que en último término dan lugar a estrés oxidativo, angiogénesis, proliferación celular o muerte por apoptosis, dependiendo del tipo celular del que se trate. Estos mecanismos son la base de las complicaciones de la diabetes. La activación de los RAGE también induce la fosforilación de CREB, a través de la activación de la ruta MEK1/2-ERK1/2-Rsk2. Toth *et al.* observaron que existe una relación importante entre la expresión de RAGE y las anomalías en la sustancia blanca de un modelo experimental de diabetes (Toth *et al.*, 2006). Además de la relación de los AGEs con la atrofia de la sustancia blanca, hay resultados que demuestran la implicación de éstos en alteraciones de la neurogénesis y en la maduración y plasticidad sináptica del Giro Dentado del hipocampo (Wang *et al.*, 2011). Estas alteraciones están mediadas por el efecto de los AGEs sobre los receptores PPAR γ (receptor activado por proliferador de peroxisoma gamma), que a través de CREB, dan lugar a una disminución de la expresión del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), que es necesario para la proliferación (Katoh-Semba *et al.*, 2002), supervivencia (Sairanen *et al.*, 2005) y plasticidad sináptica de las neuronas del Giro Dentado (Bramham & Messaoudi, 2005).

Otro estudio demuestra que la expresión de CREB en condiciones de hipoglucemia en el cerebelo de ratas diabéticas disminuye significativamente respecto a sus controles

y además coincide con los déficits observados en los test de comportamiento (Sherin *et al.*, 2010).

Además de la relación entre CREB y la encefalopatía diabética, existen evidencias experimentales de que también está implicado en el proceso patogénico de la retinopatía diabética. Recientemente, Devi *et al.* (Devi *et al.*, 2011) mostraron que el IGF-1 induce la fosforilación de CREB a través de la ruta de la glucógeno sintetasa quinasa 3 β (GSK-3 β), dando lugar a una expresión anómala de moléculas de adhesión y ciclinas, que en último término podrían favorecer la disfunción endotelial y la ruptura de la barrera hematoencefálica características de la retinopatía diabética.

5.3. FACTOR RELACIONADO CON EL FACTOR NUCLEAR

ERITROIDE 2 (Nrf2)

5.3.1. Definición y funciones:

El factor relacionado con el Factor Nuclear Eritroide 2 (NF-E2), Nrf2, es un factor de transcripción sensible a cambios redox, que pertenece a la subfamilia de los factores de transcripción CNC (*cap n collar*) y posee un cierre de leucinas en la región C-terminal (Lee & Johnson, 2004). Nrf2 se une a los elementos de respuesta antioxidante (ARE) localizados en las regiones promotoras de genes que codifican para enzimas antioxidantes, detoxificantes y transportadores xenobióticos. La inducción de estos enzimas citoprotectores y detoxificantes a través de la vía Nrf2-ARE provee a las células de una medida efectiva contra ROS y agentes tóxicos reactivos.

En condiciones normales, Nrf2 se localiza en el citoplasma, unido a su inhibidor Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*) (Itoh *et al.*, 1999). Keap1 promueve continuamente la ubiquitinación y degradación de Nrf2 en el proteasoma (Kobayashi *et al.*, 2004), manteniendo bajos los niveles de la proteína. Cuando la célula es expuesta a estrés oxidativo o químico, se modifican los residuos de cisteína de Keap1 y cambia su conformación, liberando a Nrf2. Nrf2 libre se transloca al núcleo y forma un heterodímero con las proteínas Maf pequeñas (sMaf), el heterodímero Nrf2-sMaf se une a los ARE para transcribir genes que codifican para enzimas antioxidantes y detoxificantes (NADPH quinona oxidoreductasa, glutatión S-transferasa, glutatión peroxidasa, glutamato cisteíniligasa, hemo oxigenasa, superóxido dismutasa, etc...) (Kobayashi & Yamamoto, 2005; Kaspar *et al.*, 2009).

Además de la regulación de Nrf2 mediada por Keap1, existe una diversidad de mecanismos reguladores alternativos e independientes de Keap1 como es la fosforilación de Nrf2 por varias proteínas quinasas (PKC, PI3 K/Akt, GSK-3 β , JNK); la interacción con otras proteínas (p21 y caveolina-1) y factores epigenéticos (micro RNAs y metilación de promotor) (Bryan *et al.*, 2012).

Nrf2 también responde frente a estímulos proinflamatorios y rescata a las células y tejidos de los daños que la inflamación puede provocar (Braun *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2006), reduciendo la formación de mediadores proinflamatorios perjudiciales (Kim *et al.*, 2010b).

Además de su papel en la defensa antioxidante y la inflamación, Nrf2 participa en otras funciones celulares como la diferenciación, proliferación, síntesis de lípidos, etc...

Cada vez hay más evidencias de que la expresión o función aberrante de Nrf2 está asociada con enfermedades como el cáncer (Thangasamy *et al.*, 2011), enfermedades neurodegenerativas (Cook *et al.*, 2011) y cardiovasculares, la diabetes (Negi *et al.*, 2011) e isquemia cerebral (Innamorato *et al.*, 2008; Tanaka *et al.*, 2010), y se ha demostrado que los activadores de Nrf2 tienen efectos beneficiosos sobre modelos experimentales de estas enfermedades.

5.3.2. Nrf2 y diabetes:

Recientemente se ha propuesto la idea de que Nrf2 puede ser una diana terapéutica importante en la diabetes y sus complicaciones (Zheng *et al.*, 2011). Dada la implicación del estrés oxidativo y la inflamación en la diabetes y la habilidad de Nrf2 para potenciar la defensa antioxidante de la célula, es fácil establecer el vínculo entre Nrf2 y diabetes.

Resultados experimentales muestran una disminución en la expresión de Nrf2 en el nervio ciático de animales diabéticos, comparado con sus controles (Negi *et al.*, 2011). Además de la neuropatía, se ha mostrado que Nrf2 tiene un efecto neuroprotector sobre las células ganglionares de la retina (Koriyama *et al.*, 2010; Maher & Hanneken, 2005), convirtiéndolo en una posible diana terapéutica en la retinopatía diabética. Asimismo, se ha observado que la sobreexpresión de Nrf2, junto con el tratamiento con sulforafán, prevenía el daño causado por las citoquinas y la estreptozotocina (STZ) en las células β del páncreas (Song *et al.*, 2009).

Negi *et al.* muestran que la melatonina (administrada por sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias) protege a las ratas diabéticas de alteraciones en la función nerviosa periférica y que la acción de dichos antioxidantes está mediada por la activación de enzimas antioxidantes a través de Nrf2 (Negi *et al.*, 2011).

5.4. INHIBIDOR DE QUINASAS DEPENDIENTES DE CICLINAS p21

5.4.1. Definición y funciones:

En mamíferos, el control de la proliferación se alcanza principalmente en la fase G1 del ciclo celular. La progresión del ciclo celular de fase G1 a fase S (de síntesis de ADN) está estrictamente controlada por las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs), cuya actividad está a su vez regulada por inhibidores CDKs (CKIs). Por lo tanto, la progresión del ciclo celular está negativamente regulada por los inhibidores de CDKs, que se agrupan en dos familias: los tipo Ink4/ARF (p16, p15, p18 y p19) y los tipo Cip/Kip (p21, p27 y p57) (Sherr & Roberts, 1999).

p21^{Cip1} (p21) es la diana transcripcional de p53 (factor de transcripción y supresor de tumores, modulador clave en respuestas celulares al estrés, especialmente en la apoptosis). p21 actúa en la fase G1 del ciclo, retrasando o bloqueando la progresión de la célula hacia la fase S (Sherr & Roberts, 1999). Este bloqueo de la progresión del ciclo celular es esencial para impedir que aquellas células que están expuestas a agentes que pueden dañar el ADN continúen el ciclo (el-Deiry *et al.*, 1994). p21 mantiene la célula quiescente, y su activación crónica llevaría a la célula a la detención del crecimiento y senescencia (Sherr & Roberts, 1999; Sharpless & DePinho, 2004). Por el contrario, la inhibición de p21 aumenta la proliferación celular (Gartel & Radhakrishnan, 2005).

Además de p53, existe una gran variedad de factores y transductores de señales que activan la transcripción de p21 (Gartel & Tyner, 1999). Diversos estudios muestran que p21 tiene otras funciones además de la inhibición de las CDKs, como la regulación del ciclo celular y la inhibición o mediación de la apoptosis en varias líneas tumorales (Gartel & Tyner, 2002; Fujiwara *et al.*, 2008).

Pechnick *et al.* proponen que p21 desempeña un papel importante en la regulación de la proliferación neuronal en el hipocampo adulto, ya que demostraron un aumento en la neurogénesis de la SGZ del hipocampo en ratones *knock out* para p21, y que el tratamiento con el antidepresivo imipramina disminuía notablemente los niveles de p21

(de ARNm y de proteína) y estimulaba la neurogénesis en el hipocampo (Pechnick *et al.*, 2008).

5.4.2. p21 y diabetes:

Apenas existe literatura referente a la relación entre p21 y diabetes, sin embargo, esta relación parece estar mediada por el estrés oxidativo, que como se ha descrito anteriormente es un factor principal en la diabetes y sus complicaciones. Se sabe que p21 se sobreexpresa en respuesta al estrés oxidativo, para promover la supervivencia celular (Esposito *et al.*, 1998; O'Reilly *et al.*, 2001; Poon & Hunter, 1998).

Otro vínculo que se puede establecer entre p21 y diabetes es a través de la proteína de unión al factor de crecimiento insulínico 3 (IGFBP-3). IGFBP-3 es un miembro de la familia de las proteínas de unión al factor de crecimiento insulínico (IGFBPs), que junto con los factores de crecimiento insulínicos (IGFs) y sus receptores, forman parte de la cascada de señalización del IGF. Dentro de esta ruta, los IGFBPs actúan como proteínas transportadoras y regulan el transporte, el recambio y la vida media de los IGFs circulantes (Jones & Clemmons, 1995). IGFBP-3 es la más abundante en el suero, y se ha demostrado que disminuye en el suero de pacientes diabéticos con un control glucémico pobre y que el tratamiento con insulina lo devuelve a niveles control (Akinci *et al.*, 2000). Sin embargo, White *et al.* describieron que IGFBP-3 no aumenta en cerdos diabéticos, pero el tratamiento con insulina da lugar a que se dupliquen los valores en suero con respecto a los controles (White *et al.*, 1993).

IGFBP-3 es una proteína multifactorial que desempeña diversas funciones en la circulación, el ambiente extracelular e intracelular (Georges *et al.*, 2011). Se ha descrito el papel de IGFBP-3 en la fisiopatología de diversas enfermedades humanas como el cáncer, la diabetes y la malnutrición (Jogie-Brahim *et al.*, 2009). Estudios recientes describen la interacción de IGFBP-3 con varias proteínas o rutas de señalización críticas para el control del ciclo celular (Wu *et al.*, 2013; Imamura *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2010a). IGFBP-3 puede ejercer estas funciones independientes a IGF ya que posee una señal de localización nuclear, que le permite trasladarse al núcleo y podría actuar sobre la transcripción de determinados genes (Lee & Cohen, 2002).

Wu *et al.* muestran en su estudio una disminución de la expresión de la ciclina E1 y un aumento de la expresión de p21 en varias líneas celulares tumorales, a través de la

inducción de IGFBP-3. Por tanto, proponen que el mecanismo a través del cual IGFBP-3 bloquea la célula en fase G1 es mediante la disminución en la expresión de la ciclina E1 y un aumento en la expresión de p21 (Wu *et al.*, 2013).

HIPÓTESIS

La diabetes y sus complicaciones suponen un serio problema médico y socioeconómico. Estas complicaciones afectan a varios tejidos y órganos provocando retinopatía, nefropatía, neuropatía, enfermedades cardiovasculares, etc.

La diabetes mellitus también está asociada con déficits cognitivos moderados y cambios neurofisiológicos y estructurales en el cerebro, un estado que debería ser denominado como encefalopatía diabética (Biessels *et al.*, 2002). Existen varios factores de riesgo que pueden contribuir al desarrollo de la encefalopatía diabética, como es la hiperglucemia, complicaciones vasculares, resistencia a insulina, etc. Estos factores desencadenan una serie de alteraciones moleculares que dan lugar en último término a las alteraciones estructurales y fisiológicas que subyacen a la encefalopatía diabética.

Con estos antecedentes, la hipótesis de trabajo que se plantea es:

Si existen cambios funcionales, fisiológicos y moleculares provocados por la diabetes en el hipocampo de nuestro modelo experimental; dichos cambios siguen una progresión temporal.



OBJETIVOS

Por todo ello, se plantea como objetivo principal caracterizar la evolución temporal de las posibles alteraciones funcionales y moleculares en el hipocampo de un modelo experimental de diabetes y estudiar el efecto del tratamiento preventivo con insulina.

Los objetivos específicos a estudiar son:

1. Los parámetros indicadores de estrés oxidativo (GSH y MDA).
2. La proliferación neuronal (mediante el marcaje de BrdU) en la SGZ del Giro Dentado del hipocampo.
3. Los factores de transcripción relacionados con el estrés oxidativo (NF- κ B, Nrf2), la memoria espacial (CREB y pCREB) y el ciclo celular (p21).
4. El laberinto de agua de Morris para evaluar la memoria espacial y el aprendizaje.



MATERIAL Y
MÉTODOS

1. MODELO EXPERIMENTAL:

1.1. ESTABULACIÓN Y MANEJO DE LOS ANIMALES

Para este trabajo se utilizaron ratas macho adultas de raza Wistar que procedían de una camada original de Harlan (Barcelona, España). Los animales utilizados tenían un peso al inicio de los experimentos de unos 250-300 g. Se dejaron aclimatar al menos una semana antes de iniciar los experimentos.

La estabulación se realizó en las instalaciones de la Unidad de Investigación del Departamento de Fisiología, Farmacología y Toxicología de la Universidad Cardenal Herrera-CEU donde se mantuvieron en jaulas en condiciones controladas de temperatura (20 °C) y humedad (60%), bajo ciclos constantes de luz-oscuridad de 12 horas. Durante su estabulación tuvieron libre acceso a agua y a una dieta estándar para pequeños animales de laboratorio, fabricada y distribuida por Harlan Ibérica SL (Barcelona, España).

La manipulación y cuidado de los animales se realizó siguiendo la normativa española, Real Decreto 1201/2005, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos y se tuvo la precaución de evitar cualquier estrés innecesario o infligir dolor a los mismos. Los ensayos experimentales llevados a cabo fueron aprobados por el comité ético de la Universidad CEU-Cardenal Herrera y el número de animales se redujo al mínimo necesario para garantizar la fiabilidad de los resultados obtenidos. El sacrificio de los animales se llevó a cabo mediante la técnica más incruenta, rápida e indolora que, por otra parte, no influyera en las variables consideradas en cada experimento. Las ratas fueron sacrificadas con una sobredosis de anestésico inyectada intraperitonealmente (ketamina 100 mg/kg peso + azepromazina 2,5 mg/kg peso).

1.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se indujo la diabetes en ratas Wistar con la inyección intraperitoneal de una dosis única de una solución de estreptozocina (STZ) disuelta en tampón citrato 10 mM, pH 5,5. La dosis empleada fue de 65 mg/kg de peso. La duración del experimento fue de 4 y 12 semanas a partir de la inducción de la diabetes. Las ratas se consideraron diabéticas cuando su glucemia fue superior a 12 mM (225 mg/dl) a los tres días de la inyección

con STZ. Al día siguiente de la determinación de la glucemia y agrupación de los animales en controles y diabéticos, se estableció un nuevo grupo (DIAB+INS 12S) al que se le administraba, mediante inyección subcutánea, un tratamiento de insulina a dosis 50 mUI/g. La insulina empleada fue insulina Lantus 100 UI/ml en solución (insulina glargina) y se mantuvo el tratamiento diariamente hasta la semana 12. Para llevar un seguimiento, se determinaron las glucemias y el peso de cada uno de los animales diariamente a las diabéticas y una vez por semana a las controles. Se dividieron a las ratas en cinco grupos: control y diabéticas 4 semanas; y control, diabéticas y diabéticas tratadas con insulina 12 semanas. Inicialmente, el número de animales por grupo fue de 10. Debido al hecho de que no se les administraba tratamiento a dos de los grupos diabéticos y que el experimento tenía una larga duración, a aquellas ratas diabéticas cuyo peso era inferior a 200 g (uno de los síntomas evidentes de la diabetes es la pérdida de peso) se les administraba una dosis de mantenimiento de insulina (0,02 ml insulina Humulina NPH 100 UI/ml subcutánea) que no lograba normalizar la glucemia.

Para el estudio de la neurogénesis mediante la técnica inmunohistoquímica de BrdU, la noche anterior al sacrificio los animales recibieron seis inyecciones intraperitoneales (a una dosis de 30 mg/kg) cada 2 horas de BrdU disuelto en tampón Tris 0,1 M pH 7,4.

2. OBTENCIÓN Y PROCESADO DE MUESTRAS

La obtención y el procesado de las muestras varía en función de las determinaciones para las que se vayan a emplear:

- Determinaciones bioquímicas
- Detecciones inmunohistoquímicas

2.1. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS:

Tras sacrificar las ratas con sobredosis de anestésico, se procedió a la decapitación y disección del cerebro, para la obtención de las muestras de hipocampo.

Para el análisis de los parámetros bioquímicos, las muestras se homogenizaron introduciéndolas en un homogenizador de vidrio, que contenía 1ml de tampón fosfato potásico 0,1M, pH 7, a una temperatura de 4 °C.

Inmediatamente después, se acidificaron 180µl del homogenado con 20µl de ácido perclórico (PCA) al 20%. Se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, se recogió el sobrenadante y se conservó a -20 °C hasta la determinación de la concentración de glutatión. El resto del homogenado sin acidificar se centrifugó a 6000 rpm durante 2 minutos a 4 °C, se recogió el sobrenadante e igualmente se conservó a -20 °C para la determinación de proteínas y malodialdehído.

2.2. DETECCIONES INMUNOHISTOQUÍMICAS:

Para realizar técnicas inmunohistoquímicas, las ratas se perfundieron con paraformaldehído tamponado al 4% una vez anestesiadas. Las muestras no se homogenizaron sino que se extrajo el cerebro completo y fijado, sin diseccionarlo, y se conservaron las muestras durante 12 horas en la misma solución fijadora de PFA 4% PBS 0,1M, pH 7,4 a 4 °C. Posteriormente, se cambiaron a una solución de PBS-Sacarosa 30% entre 24–48h a 4 °C. Finalmente, se incluyeron en medio de montaje OCT para poder ser seccionados coronalmente en cortes de 25 micras en el criostato (Micron).

3. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS

3.1. DETERMINACIÓN DE LA GLUCEMIA

Para la determinación de la glucemia se usó el aparato *Accutrend® Sensor* (Roche, Barcelona, España). La glucemia se determinó a través de una pequeña incisión en la cola para obtener sangre. A través de las tiras de glucemia *Accu-Chek® Sensor Comfort* (Roche, Barcelona, España) se obtuvieron los valores de glucemia en sangre expresados en mg/dl.

3.2. DETERMINACIÓN DE LA HEMOGLOBINA GLICOSILADA

3.2.1. Fundamento del método:

Para la determinación de la hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}) se utilizó un test disponible comercialmente (Biosystems, Barcelona) que consiste en un método cromatográfico-espectrofotométrico y de intercambio iónico independiente de la temperatura.

Después de preparar un hemolizado con la muestra de sangre, donde se elimina la fracción lábil, las hemoglobinas son retenidas por una resina de intercambio catiónico, eluyéndose la HbA_{1c}, previa eliminación por lavado de la HbA_{1a+b}. La estimación del porcentaje de HbA_{1c} se realiza por lectura de la absorbancia a 415 nm.

3.2.2. Soluciones:

- Solución 1. Ftalato potásico 50 mmol/L, detergente 5 g/L, azida sódica 0,95 g/L, pH 5.
- Solución 2. Tampón fosfato 30 mmol/L, pH 6,5, azida sódica 0,95 g/L.
- Solución 3. Tampón fosfato 72 mmol/L, pH 6.5, azida sódica 0,95 g/L.

3.2.3. Procedimiento:

Para la determinación de la hemoglobina glicosilada se obtiene sangre de rata, una vez anestesiada y antes de su sacrificio, extrayéndola directamente del corazón con una jeringuilla. La sangre se almacena en tubos con EDTA. La muestra así preparada es estable 10 días a 2-8 °C.

En un tubo de ensayo se pipetea 50 µl de sangre y 200 µl de solución 1. Se agita y se deja a temperatura ambiente durante 10-15 minutos. De este hemolizado se toman 50 µl, los cuales se aplican cuidadosamente sobre el disco superior de la columna. Una vez que ha penetrado todo el hemolizado, se añaden sucesivamente 200 µl y 2 ml de la solución 2 y se deja gotear, desechando el eluido. Se coloca la columna sobre un tubo de ensayo y se añaden 4 ml de la solución 3. Se recoge el eluido, que corresponde a la fracción de HbA_{1c}. Se agita el tubo de ensayo y se lee la absorbancia de esta fracción (AHbA_{1c}) a 415 nm frente al agua destilada.

Para la lectura de la absorbancia de la hemoglobina total (Hb_{TOTAL}) se pipetea en un tubo de ensayo 12 ml de la solución 3 y 50 μ l del hemolizado, se agita y se lee la absorbancia (AHb_{TOTAL}) a 415 nm frente al agua destilada.

Los cálculos se realizaron dividiendo la absorbancia de la HbA1c por 3 veces la absorbancia de la Hb_{TOTAL} .

$$\% \text{ HbA1c} = \frac{AHbA1c}{3 \times AHb_{total}} \times 100$$

3.3. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE LOWRY

3.3.1. Fundamento del método:

El contenido de proteínas de las muestras se determinó según el procedimiento descrito por Lowry *et al.* (Lowry *et al.*, 1951), con las modificaciones utilizadas habitualmente en nuestro laboratorio, y que a continuación se detallan.

3.3.2. Soluciones:

- Solución A: Na_2CO_3 4%, NaOH 0,8% (se disuelven 40 g de carbonato sódico y 8 g de hidróxido sódico en 1 litro de agua bidestilada).
- Solución B: $CuSO_4$ 1,25 mM, $C_4H_4KNaO_6$ 1,42 mM (se disuelven 200 mg de sulfato de cobre y 400 mg de tartrato sódico potásico en 1 litro de agua bidestilada). Las soluciones A y B se conservan a 4 °C hasta su utilización.
- Solución C: Reactivo de Folin-Ciocalteu 1N (se obtuvo por dilución 1:2 del reactivo de Folin-Ciocalteu comercial en agua bidestilada).
- Solución D: Solución estándar de albúmina sérica bovina (BSA) 1 mg/ml. Esta solución se conserva a -20 °C hasta su utilización.

3.3.3. Procedimiento:

Se preparan tubos de ensayo de la curva patrón con cantidades diferentes de la solución D (0, 10, 25, 50, 75 y 100 μ L) y se añade agua bidestilada hasta un volumen de 200 μ l. Los tubos de ensayo donde se añaden las muestras contienen 15 μ l de muestra y 185 μ l de agua bidestilada. Tanto la curva patrón como las muestras se hacen por duplicado. Se mezclan las soluciones A y B a partes iguales y a cada tubo de ensayo

sele añade 1 ml de esta mezcla. Se deja reaccionar durante 10 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se añaden 100 µL de la solución C (reactivo de Folin) a cada uno de los tubos. Se agita bien y se espera durante 25 ó 30 minutos. Pasado este tiempo se lee la absorbancia de cada uno de los tubos de ensayo en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 696 nm. La absorbancia a 696 nm es directamente proporcional a la concentración de proteínas. Con los valores de absorbancia de los distintos estándares obtenemos la recta patrón y por intrapolación obtenemos las concentraciones de proteínas de las muestras analizadas.

3.4. DETERMINACIÓN DE MALONDIALDEHIDO

3.4.1. Fundamento del método:

Para la cuantificación del malondialdehído de las muestras de hipocampo, se ha utilizado una modificación del método de Richard (Richard *et al.*, 1992) en el cual se determina el nivel del complejo formado entre el malondialdehído (MDA) con el ácido tiobarbitúrico (TBARS), en base a la reacción de dos moléculas de TBARS con una de MDA tras su separación por cromatografía líquida de alta resolución (Romero *et al.*, 1998).

3.4.2. Equipo y soluciones:

Se ha utilizado un equipo de HPLC (*Waters*) que consta de los siguientes componentes:

- Bomba cromatográfica: *Waters 1525 binary HPLC Pump*.
- Detector de fluorescencia: *Waters 2475 Multi λ fluorescence*.
- Inyector: *Waters 717 plus Autosampler* con loop de 50 µl.
- Controlador *Multiport* modelo RS-232.
- Ordenador *IBM Windows*.
- Software: *Breeze*.

La columna cromatográfica de separación empleada es una Kromasil C18, 5 µm de 250 x 4,6 mm (Análisis Vínicos, Ciudad Real, España). El flujo de la fase móvil es de 1,0 ml/min. La longitud de onda de excitación utilizada es de 532 nm y la de emisión 553 nm. El voltaje del detector de fluorescencia empleado es de 600 y la respuesta de 2

segundos. La inyección de cada muestra se hace de manera automática por el autoinyector.

La fase móvil se prepara con tampón fosfato 50 mM a pH 6,0 y metanol (mezclados en proporción 580 ml de tampón y 420 ml de metanol). Posteriormente, se filtra a través de un filtro-membrana (*Scheicher und Schuell, BioScience, Alemania*) de 0,45 μm de poro y 47 mm de diámetro.

La solución madre de calibración se prepara diariamente y se conserva en nevera a 4 °C. Dicha solución madre consiste en una concentración 20 mM de 1,1,3,3-tetraetoxipropano en etanol absoluto.

La solución de trabajo consiste en una preparación de ácido tiobarbitúrico (0,37%) y ácido perclórico (6,4%), 2:1 v/v respectivamente. La solución de trabajo también se prepara de forma diaria.

3.4.3. Procedimiento:

En tubos con tapa de rosca de 2 ml se pipetea 0,1 ml de la muestra y 0,75 ml de la solución de trabajo. A continuación se mezclan bien y se mantienen 60 minutos en un baño de agua a 95 °C. Pasado este tiempo se enfrían los tubos en hielo (4 °C) durante 10 minutos con objeto de detener la reacción. Posteriormente se centrifugan 10 minutos a 12.000 rpm. Hasta su inyección en el equipo HPLC los tubos se mantienen a una temperatura constante de 4 °C.

Puesto que el aducto MDA-TBARS es inestable a pH neutro cada muestra se neutraliza 10 minutos antes de la inyección en el equipo de HPLC. Se añaden aproximadamente 0,1 ml de hidróxido potásico 0,7 M a 0,2 ml de la mezcla que acabamos de centrifugar hasta obtener un pH de 6,0. Inmediatamente después de neutralizar centrifugamos durante 1 minuto para ayudar a precipitar sales insolubles que podrían interferir en la determinación y se procede, previo filtrado con filtros de jeringa no estériles (3 mm, 20 micras, membrana de teflón, suministrados por *Corning Laboratory Sciences Company*), a inyectar en el equipo de HPLC. Se coloca la mezcla neutralizada, centrifugada y filtrada en el autoinyector.

En cada análisis se preparó un blanco y una curva de calibración de estándares (0; 0,2; 0,4; 0,5; 1; 1,5 y 2 μM). El área del pico obtenido es directamente proporcional a la

concentración de MDA en la muestra, que se calcula por intrapolación en la recta de regresión obtenida con los estándares.

3.5. DETERMINACIÓN DE GLUTATIÓN

3.5.1. Fundamento del método:

La concentración del glutatión (GSH) en las distintas muestras se determinó por el procedimiento descrito por Reed (Reed *et al.*, 1980). El método se basa en la reacción del ácido iodoacético con los grupos tioles para formar derivados carboximetilos seguido de una derivatización cromófora de los grupos amino con el reactivo de Sanger (1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno) dando lugar a derivados N-DNP. Estos derivados son rápidamente separados por HPLC lo que permite la cuantificación de niveles nanomolares de GSH, GSSG y aminoácidos relacionados.

3.5.2. Equipo y soluciones:

Se ha trabajado con un equipo de HPLC de la marca Gilson que consta de los siguientes componentes:

- Bombas cromatográficas: Gilson 322 *Pump*.
- Detector: Gilson 156 UV/ VIS.
- Lámpara UV y visible.
- Desgasificador Gilson 864
- Autoinyector 234 Gilson con loop de 100 µl.
- *Gilson serial Input /Output Chanel (GSIOC)*.
- Ordenador 486/50 Hz.
- Software: *Unipoint™ System*.

La columna cromatográfica de separación empleada es una Kromasil Amino 5µm, de 250 x 4,6 mm (Análisis Vínicos, Ciudad Real, España). Las condiciones iniciales del flujo son de 1,0 ml/min, 80% de la fase móvil A y 20% de la fase móvil B. Estas condiciones iniciales son mantenidas durante 10 minutos seguidas de un gradiente lineal hasta el 95% de la fase móvil B durante 40 minutos y reequilibrado con las condiciones

iniciales durante 10 minutos antes del análisis de la siguiente muestra. La longitud de onda utilizada es de 365 nm. El rango del detector ultravioleta empleado es 0,005 y el tiempo de respuesta de 5 segundos. La inyección de cada muestra se realiza automáticamente con un autoinyector con capacidad para 45 muestras.

La fase móvil A se prepara con metanol al 80% (800 ml de agua calidad HPLC + 3,2 l de metanol) y la fase móvil B se prepara con acetato sódico 5M en metanol al 80% (800 ml de acetato sódico + 3,2 l de metanol). Posteriormente se filtran a través de un filtro-membrana (*Scheicher und Schuell, BioScience, Alemania*) de 0,45 μm de poro y 47 mm de diámetro. La solución madre de calibración se prepara diariamente y se conserva en nevera a 4 °C. Dicha solución madre consiste en una concentración 10 mM de glutatión reducido en agua ultrapura.

La solución 1 es una preparación de ácido iodoacético (100 mM) y m-cresol 0,2 mM. La solución 2 es una preparación de DNFB (1-fluoro-2,4-dinitrobenceno) 1,5% v/v en etanol puro. Se prepara fresco cada día y se conserva a 4 °C protegido de la luz.

3.5.3. Procedimiento:

En tubos eppendorf de 2 ml se pipetea 0,09 ml de la muestra y 0,018 ml de ácido iodoacético 100 mM en 0,2 mM de m-cresol. Cada solución se ajusta a un pH de 8,5-9 por adición de KHCO_3 3 M en KOH 10 M. Se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad antes de la adición de 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno para formar los derivados N-DNP. Éstos requieren un mínimo de 4 horas en oscuridad a 4 °C para su formación. Posteriormente se centrifugan 10 minutos a 13.000 rpm y el sobrenadante se utiliza para el análisis en el equipo de HPLC. La cantidad de muestra mínima inyectada es de 115 μl para tener la seguridad de llenar el loop de 100 μl .

En cada análisis se prepara un blanco y una curva de calibración de estándares (0; 20; 40; 50; 60; 80 y 100 μM). El área del pico obtenido es directamente proporcional a la concentración de GSH en la muestra, que se calcula por intrapolación en la recta de regresión obtenida con los estándares.

3.6. DETERMINACIONES INMUNOHISTOQUÍMICAS

3.6.1. INMUNOHISTOQUÍMICA BrdU

3.6.1.1. Fundamento del método:

La inmunohistoquímica realizada con BrdU se basa en el método descrito por Rackic (Rakic, 2002). La técnica consiste en utilizar la BrdU (5-Bromo-2'-deoxiuridina) como un análogo de la timidina que se incorpora a las cadenas de ADN de las células durante la fase S de síntesis en aquellas células que están duplicando su genoma. Es por ello por lo que podemos considerar esta prueba como un marcador de la proliferación celular, ya que se pondrán de manifiesto aquellas células que en el momento de la serie de inyecciones de BrdU estaban en proliferación y por tanto lo incorporaron a sus cadenas de ADN.

3.6.1.2. Soluciones:

- Bloqueo de la peroxidasa endógena: H₂O₂ al 3% en PBS-Tritón 0,1 % + 10% Metanol
- HCl 2 N
- Tampón Borato 0,1 M pH 8,5
- Tampón Citrato 10 mM pH 8
- PBS 0,01 M pH 7,2
- PBS-Tritón 0,1%
- Anti-BrdU biotinilado
- Suero normal de cabra al 20% en PBS-Tritón 0,1%
- ABC (complejo avidina biotina)
- DAB (Diaminobencidina)

3.6.1.3. Procedimiento:

Partimos de cortes de cerebro de 25 µm que están en PBS-Sacarosa 30% y guardados en el congelador a -30 °C. Se seleccionan los cortes en base a que presenten la misma zona del hipocampo y se montan sobre el portaobjetos. Se lavan los cortes con PBS 0,01M pH 7,2.

Después de los lavados, se procede al desenmascaramiento (hacer accesible la BrdU del ADN al anticuerpo primario) que consta de los siguientes pasos: en primer lugar, los

cortes se introducen en un baño de PBS-Tritón + Metanol 10% durante 20 minutos, a temperatura ambiente y en agitación. A continuación se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente y en agitación en Tampón Citrato 10 mM pH 6 que ha sido previamente llevado a ebullición. Después se incuban en HCl 2 N durante 30 minutos a 37 °C. Y por último, se incuban en un baño de Tampón Borato 0,1 M pH 8,5 durante 10 minutos a temperatura ambiente y en agitación. Una vez concluidos los pasos del desenmascaramiento se realizan lavados con PBS 0,01 M.

Antes de incubar los cortes con el anticuerpo primario se incuban con la solución H₂O₂ al 3% en PBS-Tritón 0,1% + 10% Metanol durante 15 minutos, a temperatura ambiente y en oscuridad para bloquear la peroxidasa endógena. A continuación se incuban los cortes con el anticuerpo primario junto con suero para bloquear a una concentración 1:200, durante toda la noche a 4 °C. En nuestro caso, el anticuerpo anti-BrdU está biotinilado, luego, no necesitamos un anticuerpo secundario. Después de lavar, se incuba con ABC (complejo avidina-biotina-peroxidasa) 1 hora, a temperatura ambiente. Este complejo se une a la biotina con la que está marcado el anticuerpo primario.

Por último, se revela la inmunohistoquímica con DAB y se tiñen los cortes con hematoxilina.

3.6.1.4. Recuento:

La cuantificación de las células BrdU positivas se llevó a cabo con el microscopio Olympus Bx40 y el software usado para ello fue el Software Fotografía NIS-Elements Br 2.30 (*Media Cybernetics*). Se analizaron un mínimo de seis secciones de hipocampo por cada rata, en las cuales se medía un área similar de la SGZ del Giro Dentado y se contaban las células marcadas. Los resultados se expresan como número de células por Unidad Arbitraria de Área (UAA).

3.6.2. INMUNOFLUORESCENCIA

3.6.2.1. Procedimiento:

Para el estudio inmunohistoquímico de p21 y los factores de transcripción CREB, pCREB, Nrf2 y NF- κ B se llevó a cabo la técnica de inmunofluorescencia, cuyo protocolo general se detalla a continuación.

Partimos de cortes de cerebro de 25 μ m que están en PBS-Sacarosa 30% y guardados en el congelador a -30 °C. Se seleccionan los cortes en base a que presenten la misma zona del hipocampo y se montan sobre el portaobjetos. Se lavan los cortes con PBS 0,01M–Tritón 0,3% pH 7,2.

Después de los lavados, se procede al desenmascaramiento con Tampón Citrato 10 mM pH 8, que ha sido previamente llevado a ebullición. Se incuban los cortes durante 30 minutos a temperatura ambiente y en agitación. A continuación, se lavan los cortes en PBS 0,01M–Tritón 0,3% y posteriormente se incuban en solución de bloqueo (suero normal de cabra al 20% en PBS-BSA 1%) durante 45 minutos a temperatura ambiente. Después del bloqueo de las uniones inespecíficas, se lavan de nuevo los cortes y se incuban con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4 °C. La solución del anticuerpo primario consiste en una mezcla del anticuerpo primario en su dilución correspondiente (ver tabla 1), junto con el anticuerpo NeuN (*neuron specific nuclear protein*, empleado como marcador de neuronas postmitóticas (Mullen *et al.*, 1992)) a una dilución 1:500 en PBS-BSA 1%. De esta forma, se lleva a cabo un doble marcaje para poder confirmar cuál de las células positivas para el anticuerpo primario correspondiente es también una neurona (NeuN positiva).

Tras la incubación con el anticuerpo primario, se lavan los cortes y se incuban con el anticuerpo secundario, que en este caso también es una mezcla de dos anticuerpos secundarios diferentes (anti-inmunoglobulinas de conejo con color de emisión verde para el marcaje de los factores de transcripción y anti-inmunoglobulinas de ratón con color de emisión rojo para el marcaje de NeuN) que permitirán diferenciar el doble marcaje. La incubación con los anticuerpos secundarios se realiza en oscuridad, durante 1 hora y a temperatura ambiente. Posteriormente se lavan los cortes en oscuridad y por último se montan con el medio de montaje *Vectashield with Dapi* (VECTOR).

Tabla 1. Listado de anticuerpos primarios y secundarios empleados para inmunohistoquímica de fluorescencia.

Anticuerpos primarios (IHQF)	Casa comercial	Referencia	Dilución	Descripción
CREB	Santa Cruz	sc-186	1:200	Policlonal de conejo
pCREB(ser 133)	Millipore	06-519	1:500	Policlonal de conejo
p21	Santa Cruz	sc-397	1:200	Policlonal de conejo
Nrf2	Santa Cruz	Sc-722	1:200	Policlonal de conejo
NF-κB p50	Santa Cruz	Sc-7178	1:500	Policlonal de conejo
NeuN	Millipore	MAB377	1:500	Monoclonal de ratón
Anticuerpo secundario (IHQF)	Casa comercial	Referencia	Dilución	
Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	Invitrogen	A11008	1:200	
Anti-Mouse IgG (Fab specific)–TRITC antibody	Sigma	T6528	1:200	

3.6.2.2. Recuento:

La obtención de las imágenes de fluorescencia de p21, CREB, pCREB, Nrf2, NF- κ B y NeuN se llevó a cabo con el microscopio de fluorescencia Leica DM 5000B, con la lámpara de fluorescencia Leica CTR 5000, la cámara Leica DFC490 y el software *Leica Application Suite* versión 2.7.0 R1 (*Leica Microsystems*). Todas las imágenes se ajustaron a un mismo brillo y contraste para hacerlas comparables. A partir de las imágenes de fluorescencia se realizaron los montajes (para observar la colocalización entre NeuN y el resto de anticuerpos primarios) y las medidas necesarias con la ayuda de los programas *Adobe Photoshop CS3* e *Image J 1.45*. Se analizaron un mínimo de seis secciones de hipocampo por cada rata, en los cuales se medía un área similar del Giro Dentado y se contaban las células marcadas (aquellas que presentaban doble marcaje). Los resultados se expresan como número de células por Unidad Arbitraria de Área (UAA).

4. TEST DEL LABERINTO DE AGUA DE MORRIS

El aprendizaje espacial y la memoria se analizan usando una variante del test de laberinto de agua de Morris (Morris *et al.*, 1982). Las ratas se entrenan para encontrar una plataforma escondida de 10 cm de diámetro y sumergida 4 cm por debajo de la superficie del agua teñida. El test se realiza en una piscina redonda de unos 2 m de diámetro y dividida en cuatro cuadrantes. El cuadrante donde se coloca la plataforma se denomina cuadrante diana. El test se basa en la capacidad de las ratas de aprender donde se encuentra la plataforma sumergida a través de pistas visuales situadas alrededor de la piscina. Por lo tanto, las ratas aprenden dónde está la plataforma invisible y se suben a ella. El parámetro que se mide es la latencia: el tiempo (en segundos) que tarda la rata en subirse a la plataforma, hasta un máximo de 90 segundos. Además, también se registra el número de veces que la rata entra en el cuadrante diana.

La tarea se realiza en una habitación específica para ello. En todo momento la temperatura del agua está controlada ($24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) y además las condiciones de luz son las mismas durante todo el tiempo en el que se desarrolla el test.

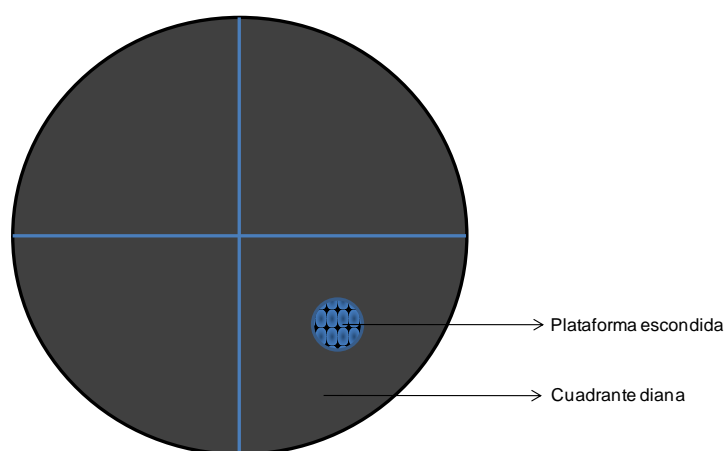


Figura 6. Esquema de la piscina del laberinto de agua de Morris.

Dos días antes del sacrificio de los animales, se inicia el test. El test dura 3 días y se realizan 3 pases por día, resultando en un total de 9 pases. El primer pase del primer día es diferente al resto, ya que el animal es colocado inicialmente en la plataforma, de modo que pueda aprender, tomando referencias visuales de donde se localiza la plataforma. En los siguientes pases, la rata se coloca de manera aleatoria en la piscina y se cronometra el tiempo que tarda en encontrar la plataforma escondida. Si la rata no encuentra la plataforma en 90 segundos, el experimentador la coloca encima de la

misma, durante 15 segundos, posteriormente la vuelve a dejar en la jaula hasta el siguiente pase.

El último día, además de los 3 pases, se realiza un último pase en el que la plataforma es visible (no está sumergida) y así se puede descartar que el tiempo en alcanzar la plataforma no esté influenciado por alteraciones visuales de los animales (y por tanto la incapacidad de tomar referencias visuales para localizar la plataforma sumergida).

Los resultados del test del laberinto de agua de Morris se expresan como latencia acumulada, es decir, el sumatorio de las latencias de los 9 pases.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos de este trabajo se ha llevado a cabo utilizando el programa SPSS, versión 15. En primer lugar, se analizan los datos para comprobar que siguen una distribución normal y se eliminan los valores atípicos. Después, se obtienen los estadísticos descriptivos de los parámetros analizados para cada grupo, éstos son la media y la desviación típica. Por último, para comparar las medias de los diferentes grupos se lleva a cabo un Análisis de la Varianza (ANOVA) de un factor. Para obtener la significación de cada comparación se realizan las comparaciones múltiples posthoc: si las varianzas de los grupos son iguales (determinado por el test de Levene de homogeneidad de varianzas) se aplica el test de Bonferroni, si no lo son se emplea el test T3 de Dunnett.

Para obtener la estadística de las correlaciones, se lleva a cabo el análisis de regresión lineal entre las variables. Del resumen del modelo de regresión lineal se obtiene el coeficiente de correlación de Pearson (R) y además, se realiza un ANOVA para conocer la significación de la correlación.

El nivel de significación escogido es de 0,05. Por lo tanto, si la significación de una comparación es menor que 0,05 rechazaremos la hipótesis de igualdad de medias y concluiremos que no todas las medias poblacionales comparadas son iguales. En caso contrario, no podremos rechazar la hipótesis de igualdad.



RESULTADOS

1. VARIABLES DESCRIPTIVAS: PESO, GLUCEMIA Y HbA1c

1.1. VARIACIÓN DEL PESO

En la tabla 2 se muestran los valores de peso (expresados como media \pm desviación típica) al final del experimento de los diferentes grupos estudiados. Se observa que hay una disminución estadísticamente significativa del peso de las ratas diabéticas, tanto a las 4 como a las 12 semanas respecto a su grupo control. También cabe destacar que el tratamiento con insulina (grupo DIAB+INS 12S) impide que las ratas diabéticas pierdan tanto peso como las del grupo diabético sin tratamiento (DIAB 12S).

1.2. ESTUDIO DE LA GLUCEMIA SANGUÍNEA

En la tabla 2 se muestran también los valores de la glucemia sanguínea (expresados como media \pm desviación típica) de los diferentes grupos al final del experimento. Se observa que los dos grupos diabéticos sin tratamiento tienen valores de glucemia muy superiores a 225 mg/dl (12 nmol/l), lo cual es considerado como hiperglucemia. Tanto los grupos controles como el grupo diabético tratado con insulina tienen valores de glucemia sanguínea normales (normoglicémicos).

1.3. ESTUDIO DE LA HEMOGLOBINA GLICOSILADA (HbA1c)

En la tabla 2 se muestran los porcentajes de hemoglobina glicosilada (expresados como media \pm desviación típica) de los diferentes grupos al final del experimento. Se observa que los dos grupos diabéticos sin tratamiento tienen valores de % HbA1c estadísticamente mayores que sus respectivos grupos control y que el grupo tratado con insulina. Cabe destacar la homogeneidad de los valores entre los grupos controles y tratado, así como entre los grupos diabéticos.

Tabla 2. Relación de peso (g), glucemia (mg/dl) y porcentaje de hemoglobina glicosilada (%HbA1c) de todos los grupos al finalizar el experimento. Resultados expresados como media \pm desviación típica. * $p < 0,05$ vs todos los grupos; † $p < 0,05$ vs CTRL 4 S; ‡ $p < 0,05$ vs CTRL 12 S; †‡ $p < 0,05$ vs DIAB+INS 12 S. El tamaño muestral de cada grupo fue como mínimo de $n=5$.

GRUPO	Peso (g)	Glucemia (mg/dl)	% HbA1c
CTRL 4S	378,95 \pm 21,55	91,21 \pm 11,61	3,27 \pm 0,93
DIAB 4S	244,40 \pm 43,11 [†]	453,19 \pm 84,47 [†]	5,84 \pm 0,71 [†]
CTRL 12S	445,76 \pm 35,17 [*]	93,76 \pm 17,21	3,24 \pm 0,86
DIAB 12S	247,54 \pm 39,15 ^{†‡}	501,65 \pm 70,83 ^{†‡}	5,86 \pm 0,87 ^{†‡}
DIAB+INS 12S	375,13 \pm 22,11	87,90 \pm 14,06	3,74 \pm 0,86

2. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS INDICADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO

2.1. ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUTATIÓN EN HOMOGENADO DE HIPOCAMPO

En la tabla 3 se muestran los valores de la concentración de GSH (nmol/mg proteína) en homogenado de hipocampo. El dato que se presenta es la medida de la determinación bioquímica realizada al finalizar el experimento y expresado como media \pm desviación típica. En la figura 7 se compara gráficamente la concentración de GSH en los diferentes grupos. Se observa una disminución estadísticamente significativa de la concentración de GSH en homogenado de hipocampo en el grupo diabético 12 semanas, comparado con su grupo control y con el tratado con insulina. No existen diferencias estadísticamente significativas entre las ratas diabéticas y los controles de 4 semanas.

2.2. ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE MALONDIALDEHÍDO EN HOMOGENADO DE HIPOCAMPO

En la tabla 3 también se muestran los valores de la concentración de MDA (nmol/mg proteína) en homogenado de hipocampo. El dato que se presenta es la medida del análisis bioquímico realizado al finalizar el experimento y expresado como media \pm desviación típica. En la figura 8 se compara gráficamente la concentración de MDA en los diferentes grupos. Se observa como después de 12 semanas desde la inducción de la diabetes hay un aumento estadísticamente significativo de la concentración de MDA en el grupo diabético, comparado con su grupo control. El tratamiento con insulina previene este aumento significativo de los niveles de MDA, aunque no los devuelve a valores control (se queda en un valor intermedio entre el control y el diabético). A las 4 semanas de diabetes no existen diferencias estadísticamente significativas entre las ratas diabéticas y los controles.

Tabla 3. Parámetros bioquímicos obtenidos a partir del homogenado de hipocampo de todos los grupos al finalizar el experimento. En la tabla se presenta conjuntamente la concentración de GSH (nmol/mg proteína) y la concentración de MDA (nmol/mg proteína). * $p < 0,05$ vs todos los grupos; † $p < 0,05$ vs CTRL 12 S; ‡ $p < 0,05$ vs DIAB+INS 12 S. El tamaño muestral de cada grupo fue como mínimo de $n=5$.

GRUPO	GSH	MDA
CTRL 4S	11,622 \pm 5,753	0,455 \pm 0,030
DIAB 4S	14,154 \pm 4,587	0,533 \pm 0,060
CTRL 12S	17,465 \pm 2,188	0,355 \pm 0,165
DIAB 12S	10,606 \pm 1,393 ^{†‡}	0,781 \pm 0,189 [*]
DIAB+INS 12S	17,517 \pm 0,820	0,540 \pm 0,100

Figura 7. Comparación de la concentración de GSH (nmol/mg proteína) obtenida a partir del homogenado de hipocampo de todos los grupos al finalizar el experimento. † p< 0,05 vs CTRL 12 S; ‡ p< 0,05 vs DIAB+INS 12 S.

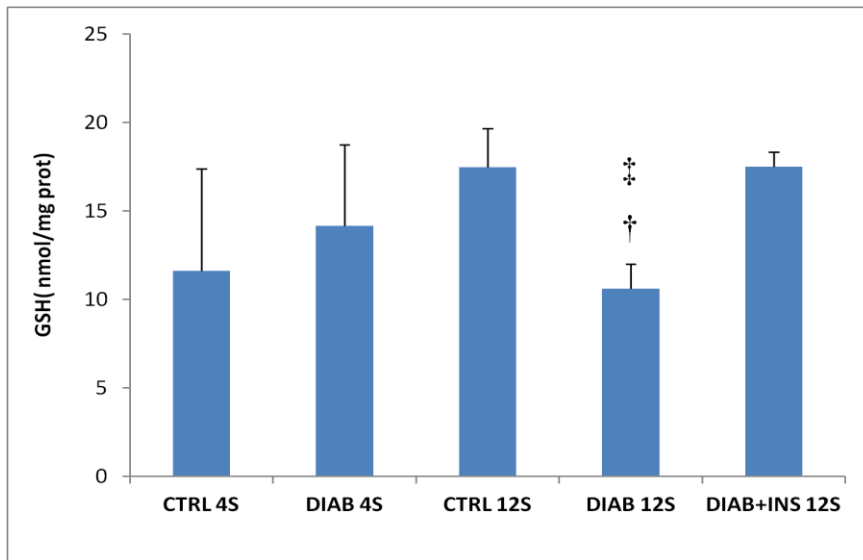
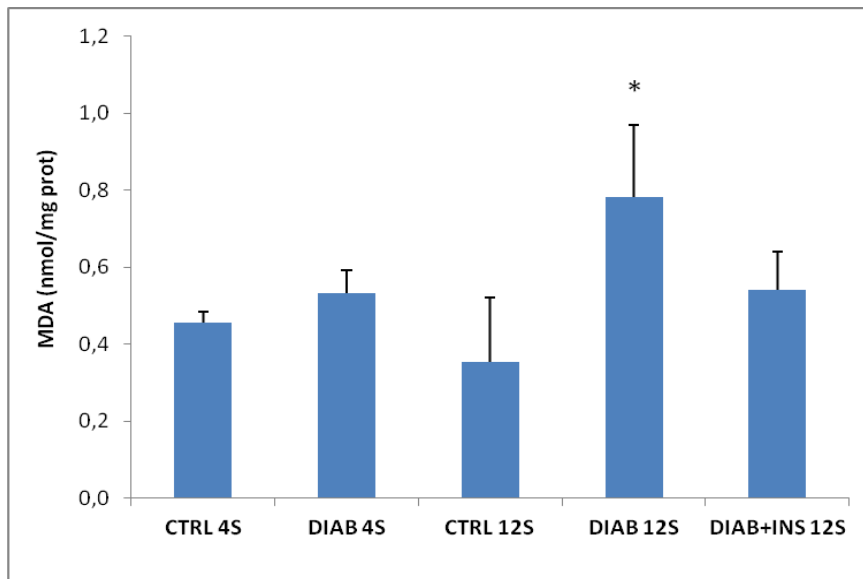


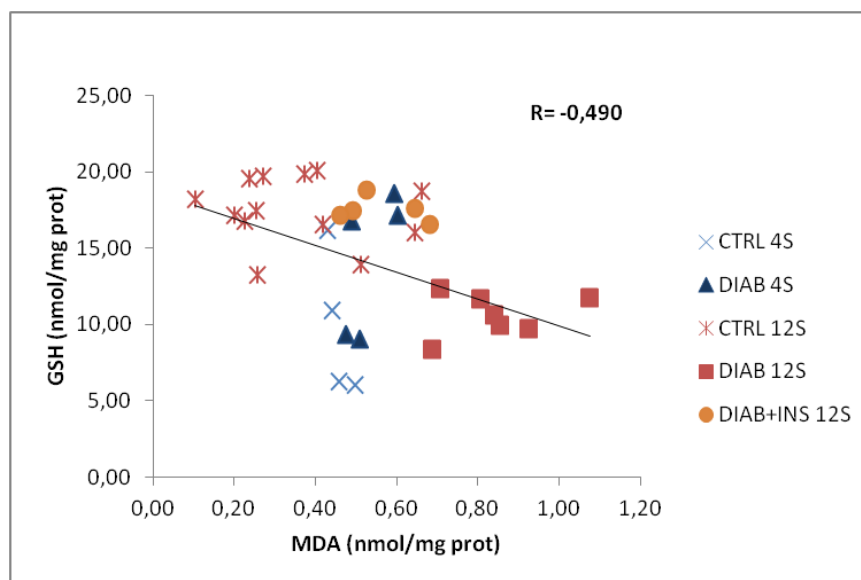
Figura 8. Comparación de la concentración de MDA (nmol/mg proteína) obtenida a partir del homogenado de hipocampo de todos los grupos al finalizar el experimento. * p< 0,05 vs todos los grupos.



2.3. CORRELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE MDA Y GSH EN HOMOGENADO DE HIPOCAMPO

En la figura 9 se muestra la correlación entre la concentración de MDA (nmol/mg proteína) y GSH (nmol/mg proteína) en homogenado de hipocampo. Se observa que existe una correlación negativa entre ambos parámetros bioquímicos y que es estadísticamente significativa. Los individuos que poseen un valor más elevado de concentración de MDA, tienen un valor de concentración de GSH menor.

Figura 9. Correlación entre la concentración de GSH (nmol/mg proteína) y la concentración de MDA (nmol/mg proteína) en homogenado de hipocampo de todos los grupos. Para la obtención de la recta y el coeficiente de regresión lineal se ha prescindido del grupo diabético tratado (DIAB+INS 12S). $p < 0,05$



3. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

3.1. DETERMINACIÓN DEL MARCAJE DE BrdU EN HIPOCAMPO

Mediante inmunohistoquímica se estudia el marcaje de células BrdU positivas en la zona subgranular (SGZ) del Giro Dentado en el hipocampo de las ratas de los diferentes grupos. En la tabla 4 se muestran los datos del recuento y se expresan como media \pm desviación típica. La figura 10 muestra gráficamente la comparación de las células BrdU positivas en la SGZ de los diferentes grupos y en la figura 11 se muestra una fotografía del marcaje de las células BrdU positivas de cada grupo. Se observa que existe una disminución de las células BrdU positivas en la SGZ a las 12 semanas de diabetes y que esta disminución es estadísticamente significativa comparado con su grupo control y el tratado con insulina. Esto indica que después de 12 semanas de diabetes se da una disminución de la proliferación en la SGZ del Giro Dentado, y que la insulina previene dicha disminución. A pesar de que también se aprecia una disminución del número de células BrdU positivas a las 4 semanas de diabetes, las diferencias no son estadísticamente significativas respecto a su control.

Tabla 4. Valores del recuento de células BrdU positivas en la zona subgranular (SGZ) del Giro Dentado del hipocampo de los diferentes grupos. † $p < 0,05$ vs CTRL 12S; ‡ $p < 0,05$ vs DIAB+INS 12 S. El tamaño muestral de cada grupo fue como mínimo de $n=3$.

GRUPO	Células BrdU positivas/ UAA
CTRL 4S	0,119 \pm 0,016
DIAB 4S	0,078 \pm 0,030
CTRL 12S	0,104 \pm 0,017
DIAB 12S	0,044 \pm 0,028 †‡
DIAB+INS 12S	0,121 \pm 0,016

Figura 10. Células BrdU positivas en la zona subgranular (SGZ) del Giro Dentado del hipocampo de todos los grupos. † $p < 0,05$ vs CTRL 12S; ‡ $p < 0,05$ vs DIAB+INS 12 S.

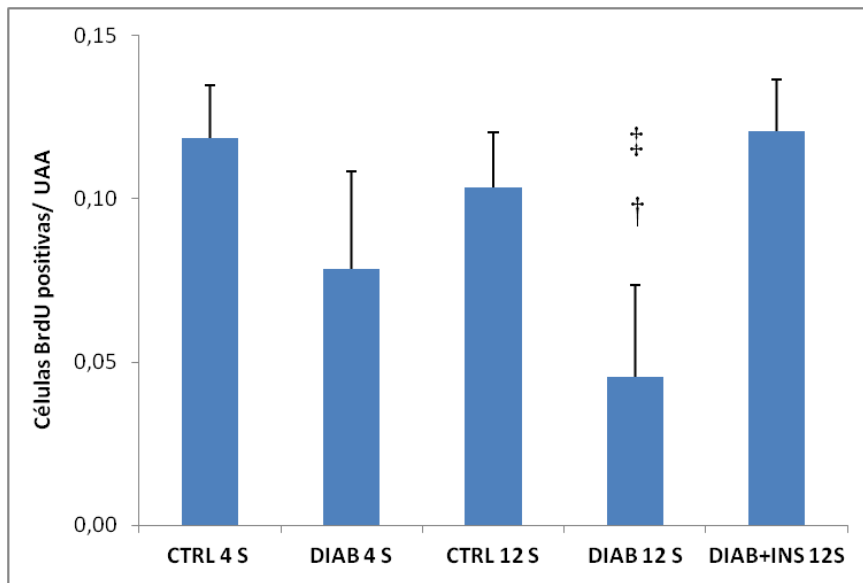
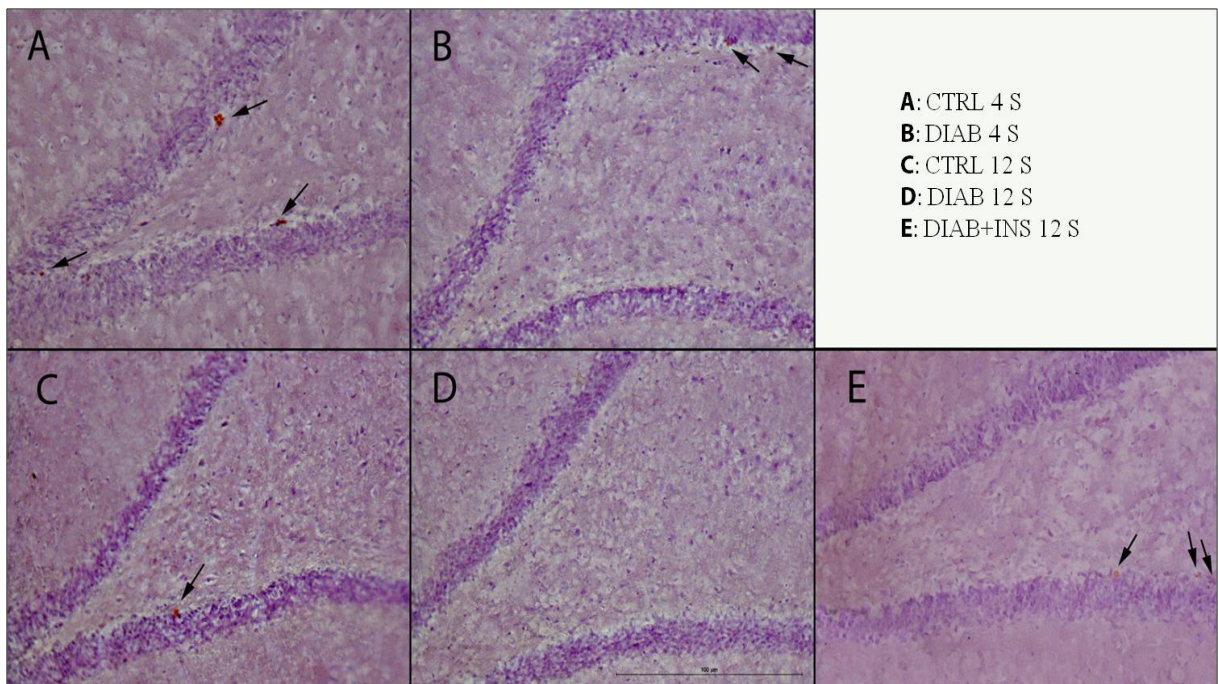


Figura 11. Fotografía de los cortes histológicos que muestra el marcaje de las células BrdU positivas en la zona subgranular (SGZ) del Giro Dentado del hipocampo de todos los grupos. Las flechas indican células proliferativas. La barra corresponde a 100 μ m.



3.2. DETERMINACIÓN DEL MARCAJE DE NF-κB EN HIPOCAMPO

Mediante inmunofluorescencia se estudia el marcaje de células NF-κB positivas en el Giro Dentado del hipocampo de los diferentes grupos. En la tabla 5 se muestran los datos del recuento y se expresan como media \pm desviación típica. La figura 12 muestra gráficamente la comparación de las células NF-κB positivas en el Giro Dentado de todos los grupos y en la figura 13 se muestra una fotografía del marcaje de fluorescencia de las células NF-κB positivas de cada grupo. Se observa que existe un aumento estadísticamente significativo del número de células NF-κB positivas a las 12 semanas de diabetes respecto a su control, y que el grupo tratado con insulina tiene unos valores del recuento intermedios entre el grupo control y el diabético. Se aprecia un aumento de las células NF-κB positivas a las 4 semanas de diabetes respecto a su control, pero estas diferencias no son estadísticamente significativas.

Tabla 5. Valores del recuento de células NF-κB positivas en el Giro Dentado del hipocampo de los diferentes grupos. † p < 0,05 vs CTRL 12S. El tamaño muestral de cada grupo fue como mínimo de n=3.

GRUPO	Células NF-κB positivas/UAA
CTRL 4S	14,227 \pm 1,318
DIAB 4S	17,175 \pm 3,098
CTRL 12S	14,211 \pm 1,971
DIAB 12S	18,697 \pm 1,170 †
DIAB+INS 12S	15,602 \pm 1,260

Figura 12. Células NF- κ B positivas en el Giro Dentado del hipocampo de todos los grupos. † $p < 0,05$ vs CTRL 12S.

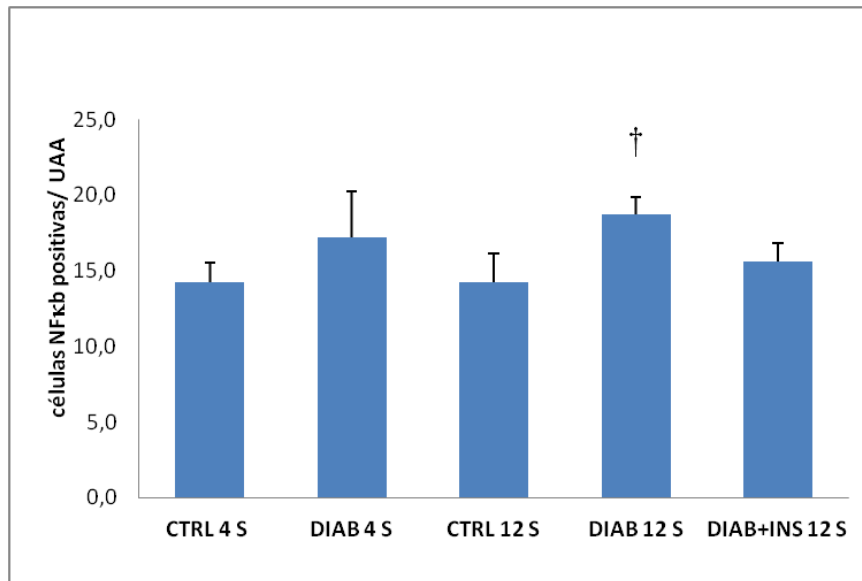
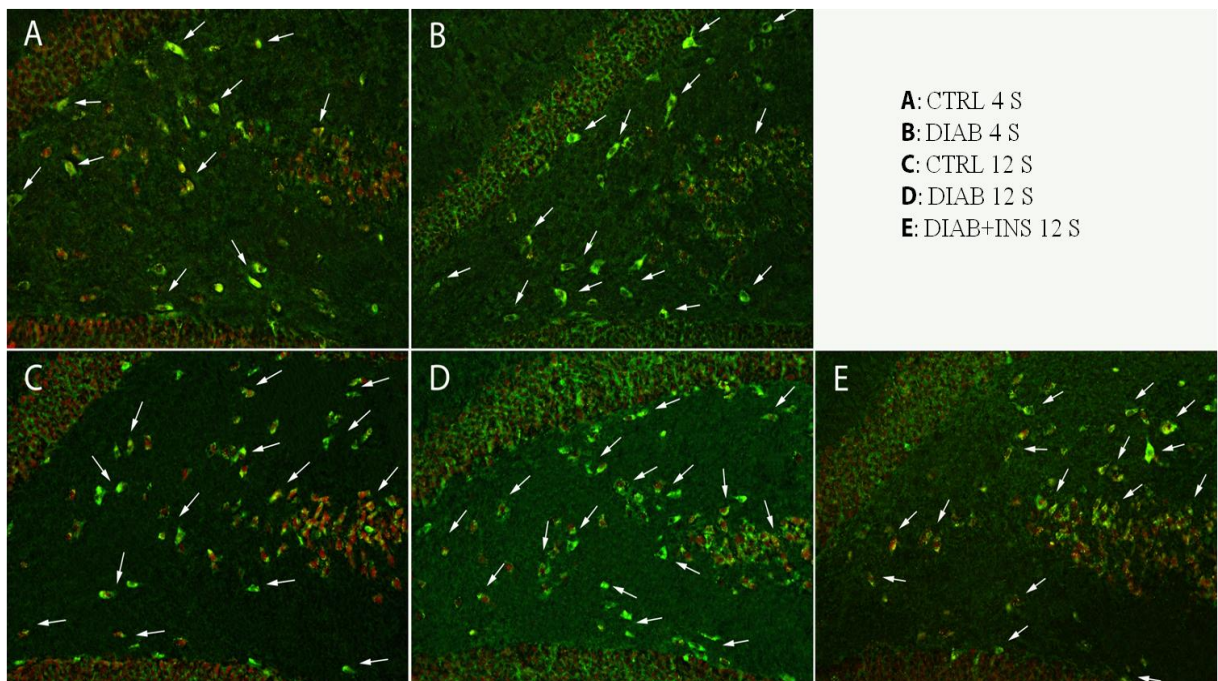


Figura 13. Fotografía de los cortes histológicos que muestra el marcaje de las células NF- κ B positivas en el Giro Dentado del hipocampo de todos los grupos. Las flechas indican células en las que se da una colocalización del marcaje de NF- κ B y NeuN.



3.3. DETERMINACIÓN DEL MARCAJE DE CREB EN HIPOCAMPO

Mediante inmunofluorescencia se estudia el marcaje de células CREB positivas en el Giro Dentado del hipocampo de los diferentes grupos. En la tabla 6 se muestran los datos del recuento y se expresan como media \pm desviación típica. La figura 14 muestra gráficamente la comparación de las células CREB positivas en el Giro Dentado de todos los grupos y en la figura 15 se muestra una fotografía del marcaje de fluorescencia de las células CREB positivas de cada grupo. Se observa que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos comparados.

Tabla 6. Valores del recuento de células CREB positivas en el Giro Dentado del hipocampo de los diferentes grupos. El tamaño muestral de cada grupo fue como mínimo de n=3.

GRUPO	Células CREB positivas/ UAA
CTRL 4S	14,202 \pm 1,294
DIAB 4S	15,368 \pm 1,179
CTRL 12S	16,973 \pm 1,883
DIAB 12S	16,352 \pm 4,856
DIAB+INS 12S	18,252 \pm 2,426

Figura 14. Células CREB positivas en el Giro Dentado del hipocampo de todos los grupos.

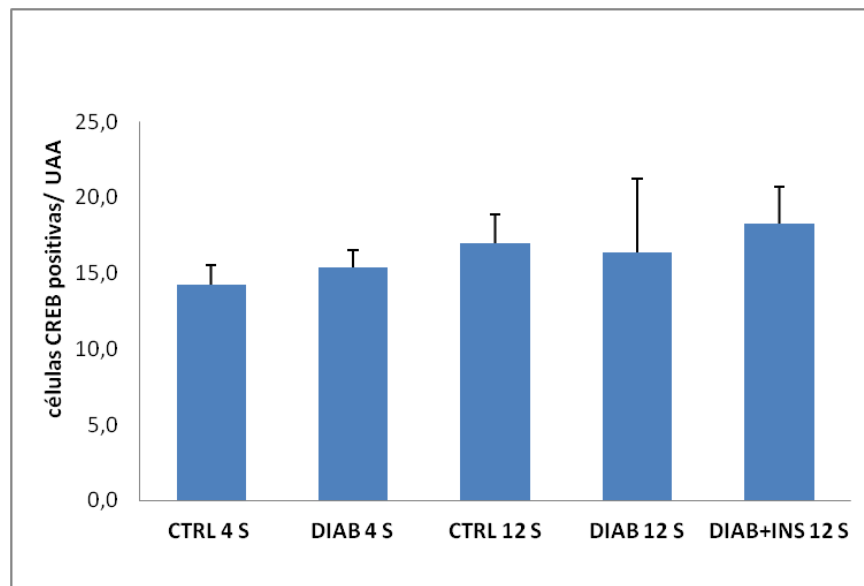
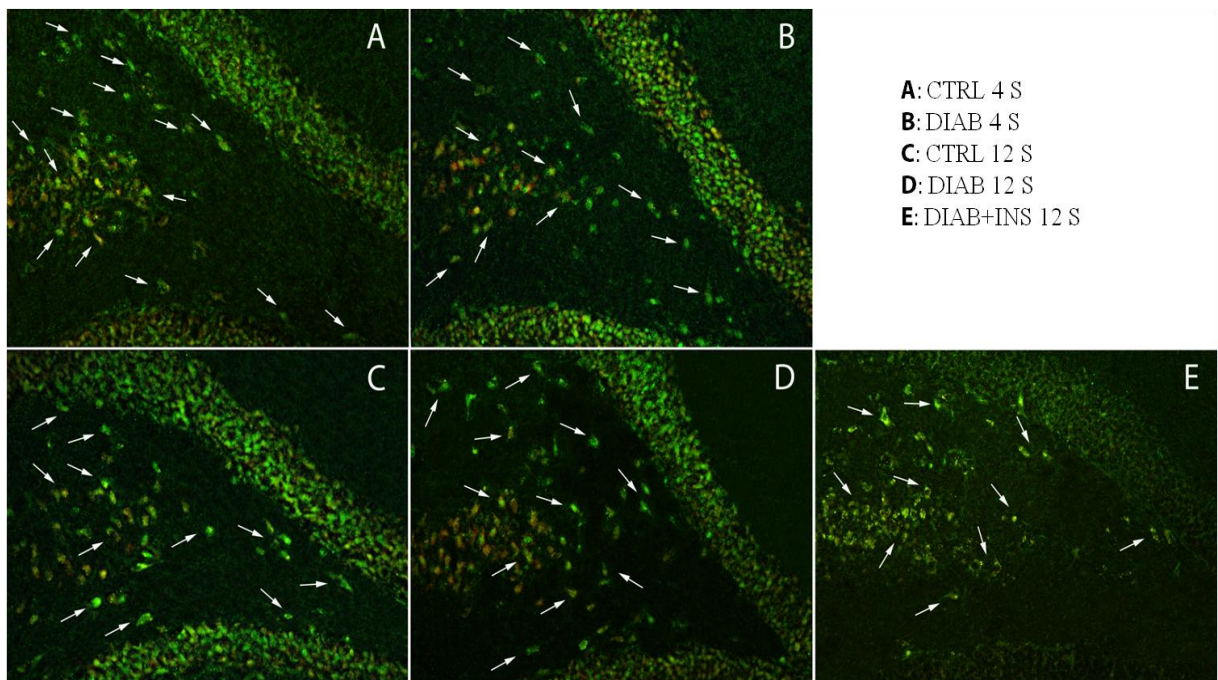


Figura 15. Fotografía de los cortes histológicos que muestra el marcaje de las células CREB positivas en el Giro Dentado del hipocampo de todos los grupos. Las flechas indican células en las que colocaliza el marcaje de CREB y NeuN.



3.4. DETERMINACIÓN DEL MARCAJE DE pCREB EN HIPOCAMPO

Mediante inmunofluorescencia se estudia el marcaje de células pCREB positivas en el Giro Dentado del hipocampo de los diferentes grupos. En la tabla 7 se muestran los datos del recuento y se expresan como media \pm desviación típica. La figura 16 muestra gráficamente la comparación de las células pCREB positivas en el Giro Dentado de todos los grupos y en la figura 17 se muestra una fotografía del marcaje de fluorescencia de las células pCREB positivas. Se observa que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos comparados, aunque se puede apreciar que tanto a las 4 como a las 12 semanas en los grupos diabéticos hay una tendencia a la disminución del número de células pCREB positivas si lo comparamos con su respectivo control o con el grupo tratado.

Tabla 7. Valores del recuento de células pCREB positivas en el Giro Dentado del hipocampo de los diferentes grupos. El tamaño muestral de cada grupo fue como mínimo de $n=3$.

GRUPO	Células pCREB positivas/ UAA
CTRL 4S	17,085 \pm 3,126
DIAB 4S	14,978 \pm 3,487
CTRL 12S	19,563 \pm 2,113
DIAB 12S	14,275 \pm 4,256
DIAB+INS 12S	18,523 \pm 2,336

Figura 16. Células pCREB positivas en el Giro Dentado del hipocampo de todos los grupos.

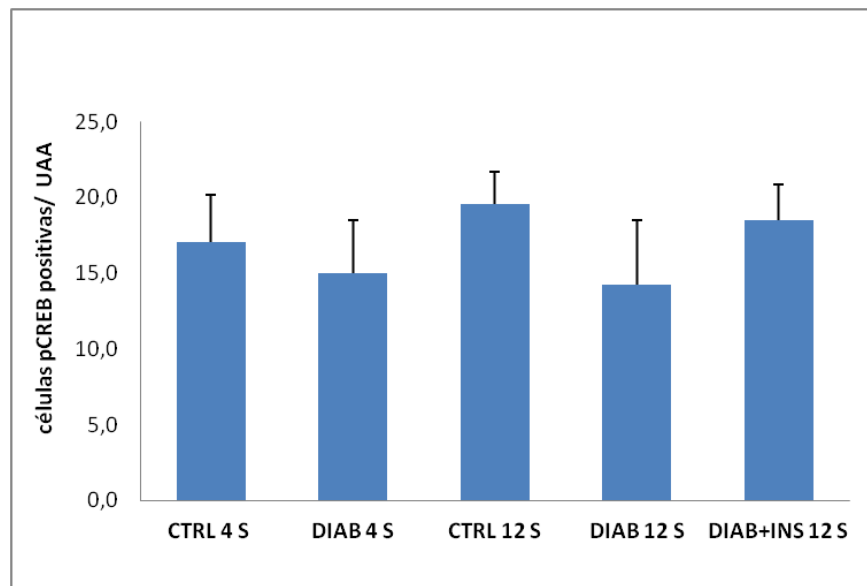
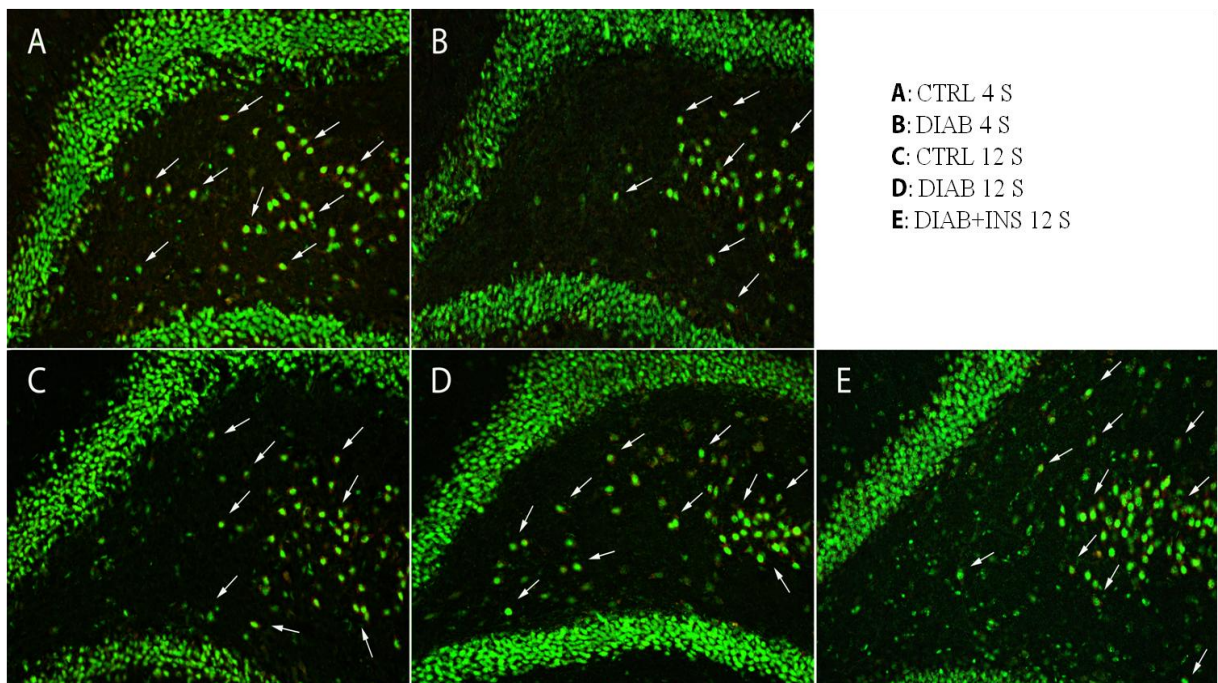


Figura 17. Fotografía de los cortes histológicos que muestra el marcaje de las células pCREB positivas en el Giro Dentado del hipocampo de todos los grupos. Las flechas indican células en las que colocaliza el marcaje de pCREB y NeuN.



3.5. DETERMINACIÓN DEL MARCAJE DE Nrf2 EN HIPOCAMPO

Mediante inmunofluorescencia se estudia el marcaje de células Nrf2 positivas en el Giro Dentado del hipocampo de los diferentes grupos. En la tabla 8 se muestran los datos del recuento y se expresan como media \pm desviación típica. La figura 18 muestra gráficamente la comparación de las células Nrf2 positivas en el Giro Dentado de todos los grupos y en la figura 19 se muestra una fotografía del marcaje de fluorescencia de las células Nrf2 positivas de cada grupo. Se observa que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos comparados. De hecho, los valores del recuento de Nrf2 en el Giro Dentado parecen bastante homogéneos si comparamos todos los grupos (las medias de los diferentes grupos son muy similares).

Tabla 8. Valores del recuento de células Nrf2 positivas en el Giro Dentado del hipocampo en los diferentes grupos. El tamaño muestral de cada grupo fue como mínimo de n=3.

GRUPO	Células Nrf2 positivas/ UAA
CTRL 4S	10,135 \pm 1,462
DIAB 4S	11,697 \pm 5,785
CTRL 12S	11,792 \pm 1,659
DIAB 12S	11,940 \pm 3,679
DIAB+INS 12S	10,599 \pm 1,529

Figura 18. Células Nrf2 positivas en el Giro Dentado del hipocampo de todos los grupos.

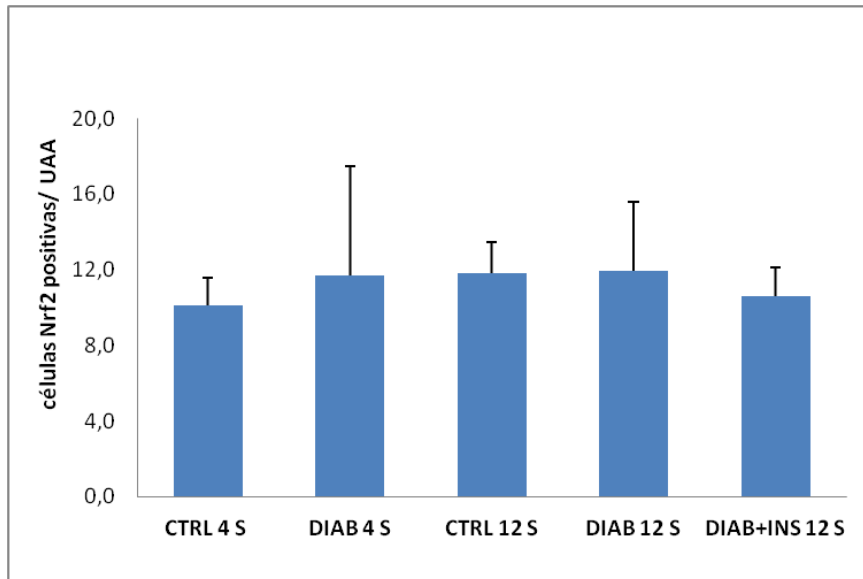
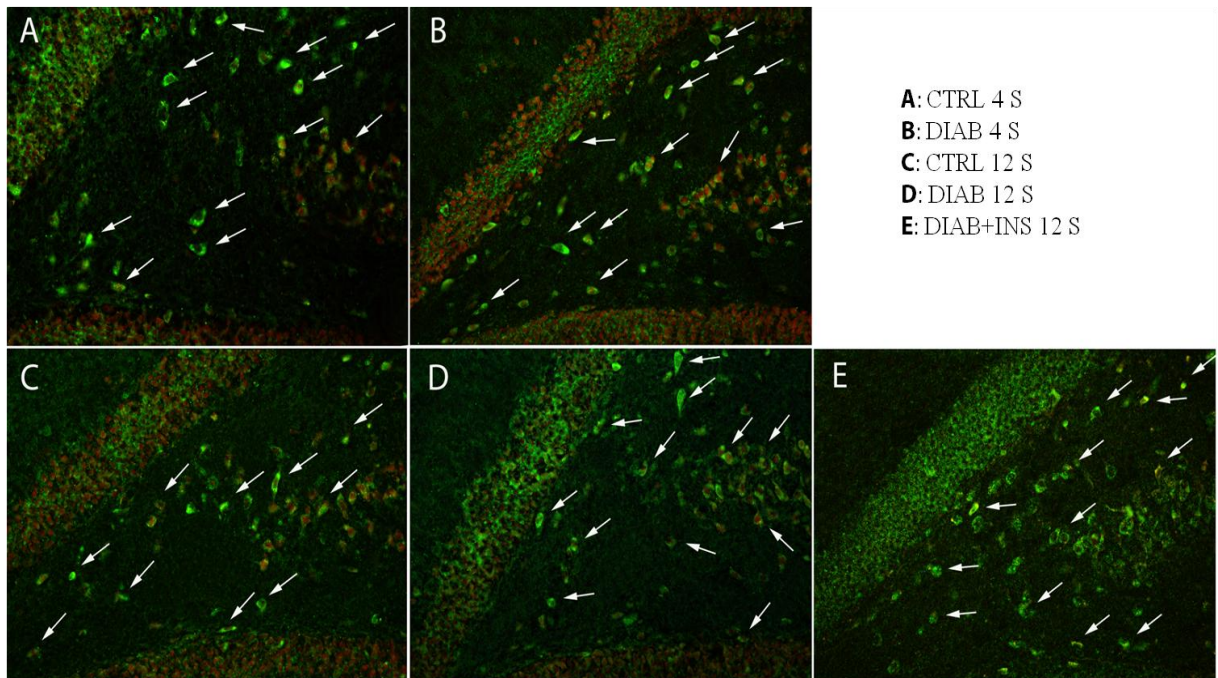


Figura 19. Fotografía de los cortes histológicos que muestra el marcaje de las células Nrf2 positivas en el Giro Dentado del hipocampo de todos los grupos. Las flechas indican células en las que colocaliza el marcaje de Nrf2 y NeuN.



3.6. DETERMINACIÓN DEL MARCAJE DE p21 EN HIPOCAMPO

Mediante inmunofluorescencia se estudia el marcaje de las células p21 positivas en el Giro Dentado del hipocampo de los diferentes grupos. En la tabla 9 se muestran los datos del recuento y se expresan como media \pm desviación típica. La figura 20 muestra gráficamente la comparación de las células p21 positivas en el Giro Dentado de todos los grupos y en la figura 21 se muestra una fotografía del marcaje de fluorescencia de las células p21 positivas. Cabe resaltar que el marcaje se localiza principalmente en el *hilus*. Se observa que existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado con insulina y el resto de grupos. Las medias de los grupos controles y diabéticos son muy similares, a diferencia del grupo tratado con insulina, que duplica la media de éstos.

Tabla 9. Valores del recuento de células p21 positivas en el Giro Dentado del hipocampo de los diferentes grupos. El tamaño muestral de cada grupo fue como mínimo de n=3.

GRUPO	Células p21 positivas/ UAA
CTRL 4S	7,320 \pm 3,094
DIAB 4S	9,004 \pm 3,540
CTRL 12S	9,375 \pm 1,009
DIAB 12S	10,138 \pm 2,799
DIAB+INS 12S	20,781 \pm 4,500 *

Figura 20. Células p21 positivas en el Giro Dentado del hipocampo de todos los grupos. * $p < 0,05$ vs todos los grupos.

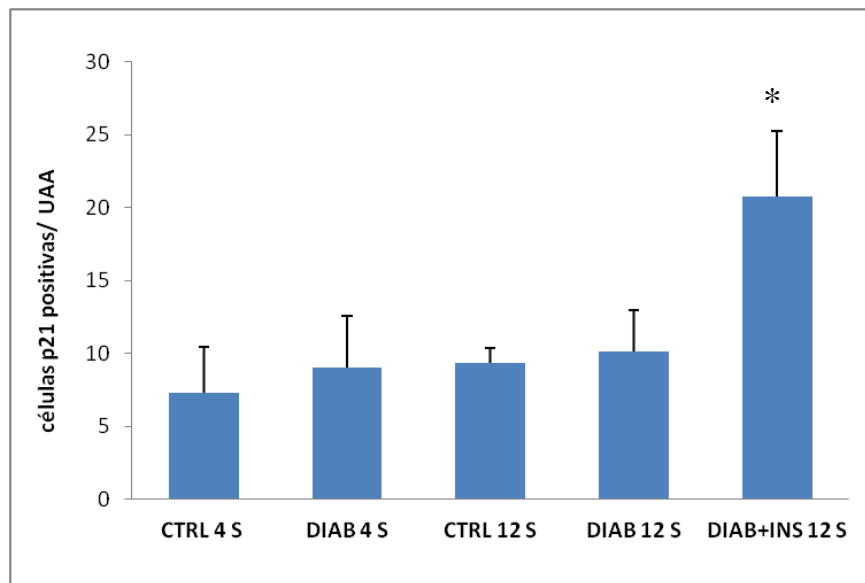
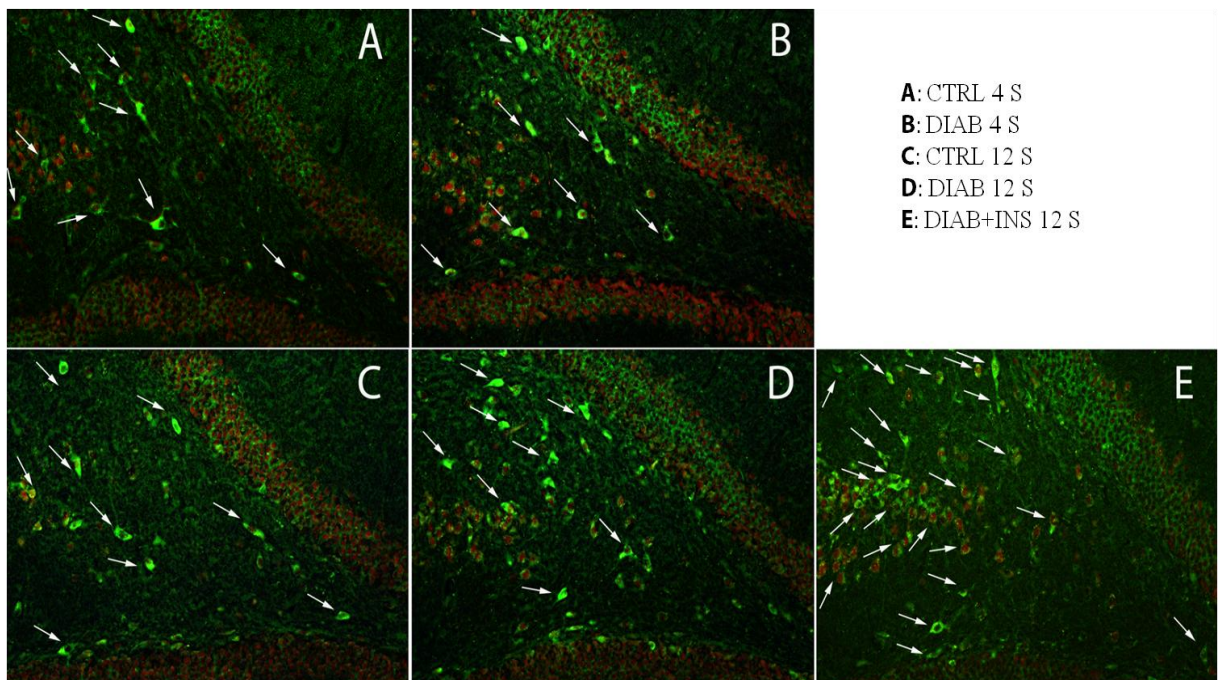


Figura 21. Fotografía de los cortes histológicos que muestra el marcaje de las células p21 positivas en el Giro Dentado del hipocampo de todos los grupos. Las flechas indican células en las que colocaliza el marcaje de p21 y NeuN.



3.7. CORRELACIONES DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN ENTRE SÍ

Existe una serie de correlaciones entre algunos de los factores de transcripción que se han determinado mediante inmunohistoquímica y que se muestran a continuación.

En la figura 22 se representa la correlación entre el número de células p21 y Nrf2 positivas del Giro Dentado. Se trata de una correlación positiva y estadísticamente significativa en la que se observa que a valores bajos del recuento de p21 le corresponden valores bajos de Nrf2 y a medida que aumenta el número de células p21 positivas, también aumentan las células Nrf2 positivas.

En la figura 23 se muestra la correlación entre el recuento de pCREB y NF- κ B. Esta correlación es negativa y estadísticamente significativa, donde se observa que a valores elevados del recuento de NF- κ B le corresponden valores bajos de pCREB y conforme aumentan los valores de pCREB, disminuyen los de NF- κ B. También existe una correlación negativa y estadísticamente significativa entre el recuento de NF- κ B y el de BrdU (figura 24).

Figura 22. Correlación entre el recuento de células p21 positivas del Giro Dentado (células positivas/UAA) y de células Nrf2 positivas de todos los grupos. Para la obtención de la recta y el coeficiente de regresión lineal se ha prescindido del grupo diabético tratado (DIAB+INS 12S). $p < 0,05$.

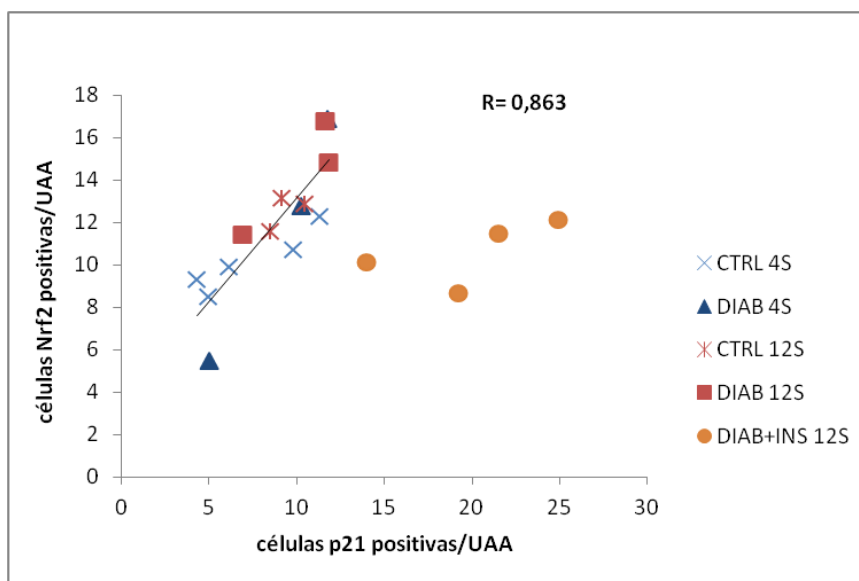


Figura 23. Correlación entre el recuento de células pCREB positivas del Giro Dentado (células positivas/UAA) y de células NF- κ B positivas de todos los grupos. Para la obtención de la recta y el coeficiente de regresión lineal se ha prescindido del grupo diabético tratado (DIAB+INS 12S). $p < 0,05$.

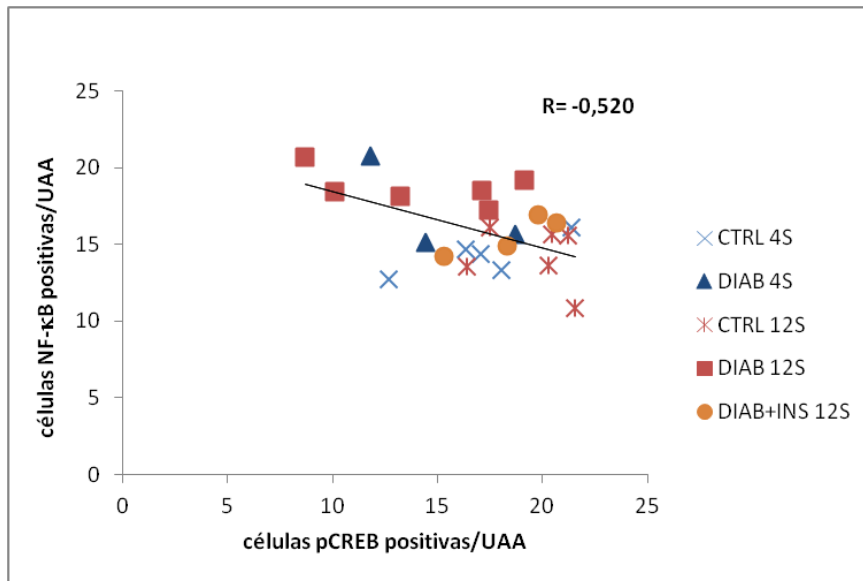
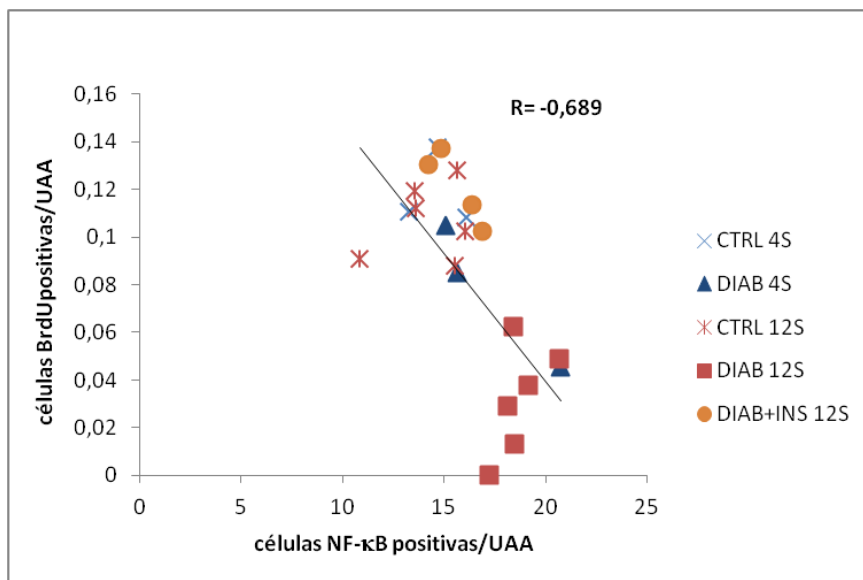


Figura 24. Correlación entre el recuento de células NF- κ B positivas del Giro Dentado (células positivas/UAA) y de células BrdU positivas de todos los grupos. Para la obtención de la recta y el coeficiente de regresión lineal se ha prescindido del grupo diabético tratado (DIAB+INS 12S). $p < 0,05$.



4. ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO

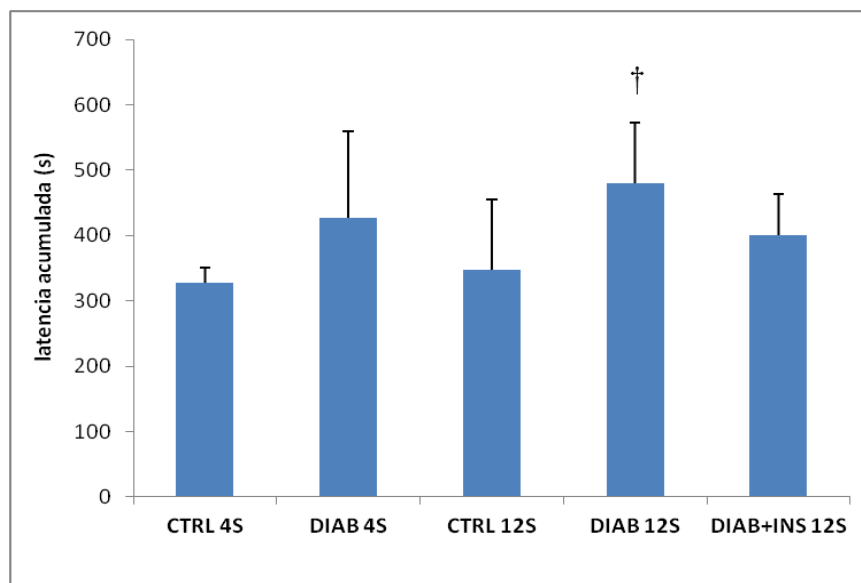
4.1. TEST DEL LABERINTO DE AGUA DE MORRIS

En la tabla 10 se muestran los valores de la latencia acumulada para alcanzar la plataforma invisible en el test de laberinto de agua de Morris. Los datos se expresan como media \pm desviación típica. En la figura 25 se muestra gráficamente la comparación entre la latencia acumulada de los diferentes grupos. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el diabético a las 4 semanas, pero sí existen diferencias a las 12 semanas. El grupo diabético de 12 semanas presenta un valor de latencia acumulada mayor que su control, y la diferencia entre estos dos grupos es estadísticamente significativa. El grupo tratado con insulina tiene un valor de latencia acumulada intermedio entre el diabético y el control.

Tabla 10. Latencia acumulada (s) en alcanzar la plataforma en el laberinto de agua de Morris. † $p < 0,05$ vs CTRL 12 S. El tamaño muestral de cada grupo fue como mínimo de $n=8$.

GRUPO	Latencia acumulada laberinto de agua (s)
CTRL 4S	327,286 \pm 23,991
DIAB 4S	426,500 \pm 133,201
CTRL 12S	348,304 \pm 106,272
DIAB 12S	480,474 \pm 92,113 †
DIAB+INS 12S	401,222 \pm 61,743

Figura 25. Latencia acumulada (s) en alcanzar la plataforma en el test de memoria (laberinto de agua de Morris). † p<0,05 vs CTRL 12 S.



4.2. CORRELACIONES ENTRE LATENCIA ACUMULADA DE MORRIS Y ALGUNOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

La latencia acumulada del laberinto de agua de Morris se correlaciona con algunos de los factores de transcripción analizados anteriormente.

En la figura 26 se muestra la correlación entre la latencia acumulada del laberinto de agua de Morris y las células BrdU positivas de la SGZ. Esta correlación es negativa y estadísticamente significativa. Se observa que a medida que aumenta el número de células BrdU positivas, disminuye la latencia acumulada de dicho test (y por tanto el tiempo en realizar la tarea). También existe una correlación negativa y estadísticamente significativa entre la latencia acumulada del laberinto de agua y las células pCREB positivas (figura 27). Al igual que ocurre con BrdU, conforme aumenta el número de células pCREB positivas, disminuye la latencia acumulada del laberinto de agua.

Figura 26. Correlación entre la latencia acumulada en el laberinto de agua (s) y las células BrdU positivas de la SGZ del Giro Dentado (células positivas/UAA) de todos los grupos. Para la obtención de la recta y el coeficiente de regresión lineal se ha prescindido del grupo diabético tratado (DIAB+INS 12S). $p < 0,05$.

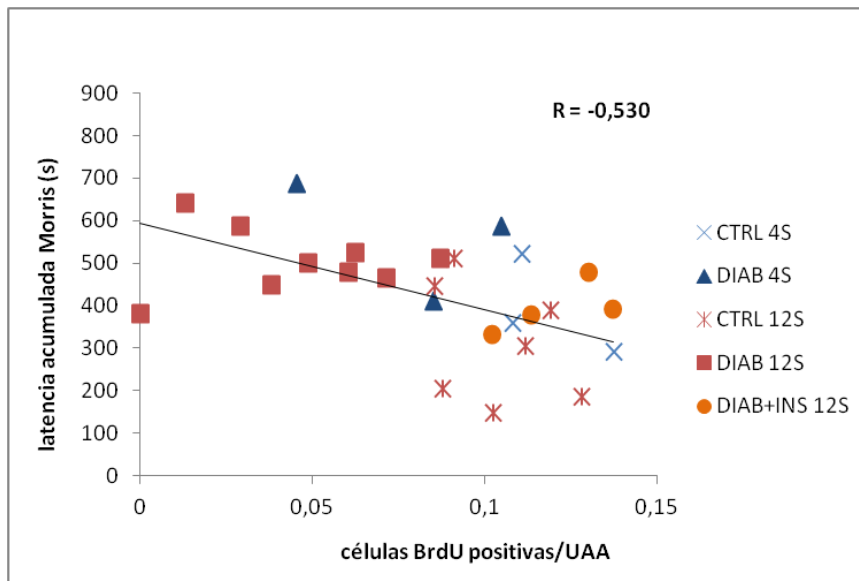
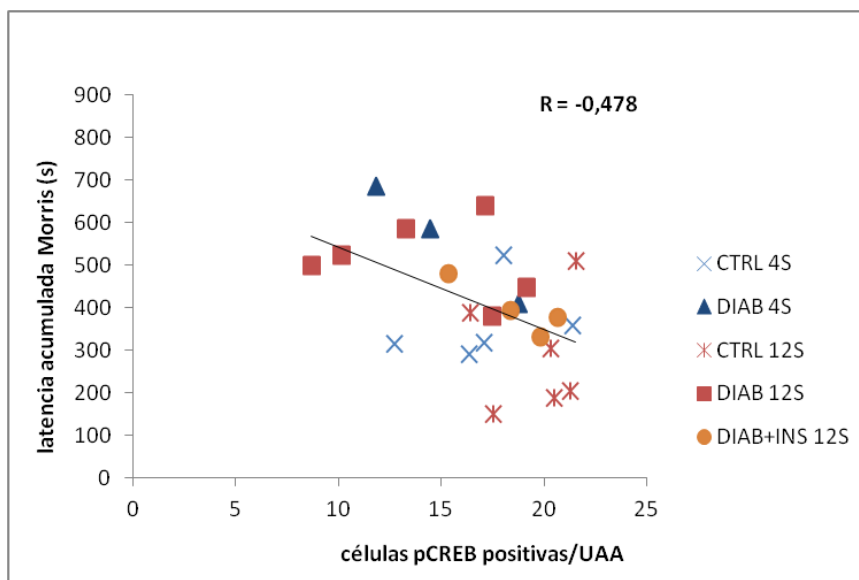


Figura 27. Correlación entre la latencia acumulada en el laberinto de agua de Morris (s) y las células pCREB positivas en el Giro Dentado (células positivas/UAA) de todos los grupos. Para la obtención de la recta y el coeficiente de regresión lineal se ha prescindido del grupo diabético tratado (DIAB+INS 12S). $p < 0,05$.



DISCUSIÓN

1. VARIABLES DESCRIPTIVAS DEL MODELO EXPERIMENTAL

El modelo animal empleado en este trabajo se engloba en aquellos modelos en los que la diabetes es inducida mediante procedimientos experimentales que interrumpen la producción de insulina (Shafrir, 1997), por lo que simula una diabetes tipo 1. Concretamente, se induce la diabetes a través de una inyección intraperitoneal de estreptozotocina (STZ), que es un agente β -citotóxico. La STZ es un componente que es captado por las células a través del transportador de glucosa GLUT-2, que es muy abundante en las células β de los islotes de Langerhans (Schneidl *et al.*, 1994). GLUT-2 no está presente en las células que forman la barrera hematoencefálica (Kumagai, 1999), por ello se puede descartar la existencia de un efecto directo de la STZ sobre el cerebro. Los roedores cuya diabetes ha sido inducida con STZ son hipoinsulinémicos, pero no requieren tratamiento con insulina para sobrevivir, por ello es posible la existencia de grupos diabéticos sin tratar.

Al igual que los pacientes diabéticos, las ratas diabéticas por STZ sufren complicaciones secundarias que afectan a los ojos, riñones, corazón, capilares sanguíneos y sistema nervioso periférico y central (Hames *et al.*, 1995; Kowluru, 2003; Schmeidel *et al.*, 2003; Kuhad & Copra, 2007; American Diabetes Association, 2010; Palsamy & Subramanian, 2011).

Tras la inyección intraperitoneal de estreptozotocina a los grupos diabéticos, se observaron a lo largo del experimento unos valores de glucemia superiores a 225 mg/dl (12 nmol/l), que fueron restablecidos a valores control con el tratamiento de insulina (tabla 2). La valoración de la glucemia nos da una información directa sobre la existencia de hiperglucemia en los grupos diabéticos. La hiperglucemia se desarrolla principalmente por el efecto citotóxico de la estreptozotocina sobre las células β del páncreas y como consecuencia de la ausencia de insulina (Junod *et al.*, 1967).

Además del análisis de la glucemia, el porcentaje de HbA1c se emplea como marcador crónico de la glucemia, ya que refleja el promedio de las concentraciones de glucosa en sangre de un periodo de tiempo de 2 ó 3 meses. En la tabla 2 de los resultados se observa un aumento estadísticamente significativo del porcentaje de HbA1c en los grupos diabéticos sin tratamiento, comparado con sus respectivos

controles y con el grupo tratado con insulina. El porcentaje de HbA1c se correlaciona con las complicaciones micro y macrovasculares de la diabetes y se usa como marcador estándar de la eficacia del control glucémico (American Diabetes Association, 2010). De este modo podemos concluir que el tratamiento con insulina permite un buen control glucémico, ya que restablece los porcentajes de HbA1c a valores control.

En este estudio se ha podido observar que, tanto a las 4 como a las 12 semanas desde la inducción de la diabetes, las ratas presentaron una disminución en el peso corporal al compararlas con sus respectivos controles y con el grupo tratado con insulina (tabla 2). Esta disminución del peso corporal es un síntoma característico de la diabetes provocado por la hiperglucemia (American Diabetes Association, 2010).

2. IMPLICACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA ENCEFALOPATÍA DIABÉTICA

Diversos autores sugieren que el estrés oxidativo está implicado en la patogénesis de las complicaciones tardías de la diabetes (Mohamed *et al.*, 1999; Pazdro & Burgess, 2010; Miranda *et al.*, 2007; Muriach *et al.*, 2006) y que el daño oxidativo en diversas regiones cerebrales da lugar a anomalías morfológicas del cerebro y alteraciones de la memoria (Fukui *et al.*, 2001). Se ha propuesto que un aumento del estrés oxidativo y/o una deficiencia de los agentes antioxidantes puede dar lugar a un déficit cognitivo (Berr *et al.*, 2000).

Existen muchas evidencias experimentales a favor de que el aumento del estrés oxidativo en la diabetes produce daño oxidativo en varias regiones del cerebro de rata, incluido el hipocampo (Reagan, 2002; Aragno *et al.*, 2002; Grillo *et al.*, 2003), que es más sensible al estrés oxidativo que otras partes del cerebro (Reagan *et al.*, 2000). La diabetes induce un incremento de los productos de peroxidación lípida, como el HNE o el MDA (Baydas *et al.*, 2005; Ates *et al.*, 2006; Muriach *et al.*, 2006; Alvarez-Nölting *et al.*, 2011) y un descenso de la defensa antioxidante como el GSH, las enzimas catalasa o superóxido dismutasa (Uluslu *et al.*, 2003; Ates *et al.*, 2007). El aumento de la formación de radicales libres junto con la disminución de las defensas antioxidantes es uno de los mecanismos implicados en la disfunción cognitiva asociada a la diabetes (Kamboj *et al.*, 2008; Kuhad & Chopra, 2008; Saxena *et al.*, 2007).

Los resultados de este trabajo concuerdan con la bibliografía anteriormente citada ya que muestran una disminución de la concentración del GSH y un aumento de la concentración de MDA en el hipocampo de ratas después de 12 semanas de diabetes (tabla 3). Este descenso del GSH y aumento del MDA no son significativos a las 4 semanas de diabetes, por lo que la disminución de las defensas antioxidantes y el aumento de la peroxidación lipídica se manifiestan en una fase tardía de la diabetes. El tratamiento con insulina previene estos cambios bioquímicos observados en el hipocampo diabético a las 12 semanas, seguramente porque al disminuir la concentración de glucosa en sangre y evitar una hiperglucemia crónica, se atenúa la formación de radicales libres y la disminución de las defensas antioxidantes.

Tanto la disminución de la concentración de GSH como el aumento del MDA son parámetros que confirman la existencia de estrés oxidativo en el hipocampo de ratas diabéticas. Estos dos parámetros se correlacionan (figura 9) de forma que el aumento de MDA está asociado con un descenso de la concentración de GSH y viceversa, es decir, el aumento de la peroxidación lipídica se da juntamente con la disminución de las defensas antioxidantes.

La peroxidación lipídica puede ser especialmente perjudicial para las neuronas, ya que éstas poseen una gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados en su membrana. La peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana altera su estructura y disposición espacial dañando así su actividad biológica. De igual forma, resultan también afectadas las proteínas de transporte y otros sistemas de regulación de las membranas, disminuyendo su fluidez y deteriorando sus funciones (Mark *et al.*, 1997).

La hiperglucemia es uno de los principales factores que contribuyen al estrés oxidativo, y lo hace directamente a través de la producción de ROS, o bien de forma indirecta, alterando el equilibrio redox. Estudios previos indican que un aumento de ROS y una disminución de la defensa antioxidante hace que las neuronas y los astrocitos sean más susceptibles al daño producido por la diabetes (Guyot *et al.*, 2000). Los ROS producidos como consecuencia de la hiperglucemia pueden estimular la producción de citoquinas proinflamatorias y la expresión de NF- κ B, que se asocian a los déficits cognitivos de la diabetes (Kuhad *et al.*, 2009). Además, los ROS contribuyen al

aumento de la muerte neuronal a través de la oxidación de proteínas, daño al ADN y peroxidación de lípidos de membrana (Hawkins & Davies, 2001).

El daño oxidativo afecta a las sinapsis del córtex cerebral e hipocampo de ratas diabéticas, contribuyendo al déficit en las funciones cognitivas (Fukui *et al.*, 2001). Existe una extensa investigación acerca del efecto beneficioso de diversos antioxidantes sobre estos déficits cognitivos y sobre la memoria (Saxena *et al.*, 2007; Kuhad & Chopra, 2007; Kuhad & Chopra, 2008; Kuhad *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2012b). El uso de Vitamina E como antioxidante reduce el daño oxidativo sobre las sinapsis del hipocampo y por consiguiente, mejora los déficits de aprendizaje y memoria (Fukui *et al.*, 2002).

3. ALTERACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN NEURONAL EN EL GIRO DENTADO

La neurogénesis “adulta” es la producción de nuevas neuronas en el cerebro adulto. Este término comprende un proceso complejo que empieza con la proliferación de las células progenitoras, seguido de una restricción del fenotipo neuronal y una maduración de las características morfológicas y fisiológicas, continúa con el desarrollo de las características funcionales de la neurona y finaliza con la existencia de una nueva neurona funcional e integrada (Balu & Lucki, 2009).

En el hipocampo adulto, la neurogénesis se restringe a la SGZ del Giro Dentado, donde las células progenitoras proliferan, migran hacia la capa granular y allí se diferencian en células granulares maduras (Cameron *et al.*, 1993; Heine *et al.*, 2004). Funcionalmente, la producción de nuevas neuronas se asocia con el aprendizaje, la memoria y la adquisición de la respuesta condicionante (Gould *et al.*, 2000; Shors *et al.*, 2002). Aunque acerca de esta cuestión existe cierta controversia, ya que los resultados de los experimentos donde se elimina la neurogénesis para estudiar cómo contribuye a la función del hipocampo son contradictorios (Shors *et al.*, 2002; Raber *et al.*, 2004).

Se ha demostrado en diversos modelos experimentales que la diabetes afecta a la neurogénesis del hipocampo (Stranahan *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008), lo cual sugiere una explicación frente a los déficits de memoria que ocurren en muchos pacientes

diabéticos (Wang *et al.*, 2011). Hay evidencias que sugieren que la falta de insulina o la hiperglucemia pueden ser factores que contribuyan a la reducción de la neurogénesis en la diabetes (Zhang *et al.*, 2008).

En este trabajo nos centramos en el estudio de la proliferación de la neurogénesis adulta. Para estudiar la posible afectación de la diabetes sobre la proliferación neuronal, se ha empleado el marcaje con bromodeuxiridina (BrdU) y se ha observado que existen diferencias significativas en el número de células BrdU positivas de la SGZ del Giro Dentado a las 12 semanas de diabetes (tabla 4, figuras 10 y 11). Estos resultados están en consonancia con otros estudios en los que se observa un descenso de la proliferación neuronal en animales diabéticos respecto a los controles (Jackson-Guilford *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2008; Beauquis *et al.*, 2006). Además, se observa que el tratamiento con insulina previene esta disminución de la proliferación (tabla 4).

Podemos dar una posible explicación a la disminución de la proliferación neuronal en el hipocampo de ratas diabéticas a través de la alteración en la expresión de algunos de los factores de transcripción, como CREB, inducida por la diabetes, como se explicará más adelante. Además, algunos autores han implicado el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y el factor de crecimiento insulínico-I (IGF-I) en la disminución de la proliferación neuronal (Cheng *et al.*, 2001; Katoh-Semba *et al.*, 2002; Sairanen *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2011; Duan *et al.*, 2010).

4. CAMBIOS MOLECULARES QUE SUBYACEN LA ENCEFALOPATÍA DIABÉTICA: FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

4.1. NF- κ B

La diabetes da lugar a la activación de NF- κ B, ya sea como respuesta a la alteración en la señalización de la glucosa (Xu & Sima, 2001; Pierson *et al.*, 2002) o por la unión de los productos de glicación no enzimática a sus receptores (unión AGEs-RAGE) (Schmidt *et al.*, 1999; Bierhaus *et al.*, 2001; Kuhad *et al.*, 2009).

NF- κ B es una molécula que participa en una gran variedad de rutas de señalización y desempeña una función reguladora bidireccional en múltiples respuestas fisiológicas y

patológicas. Por un lado, NF- κ B promueve la supervivencia neuronal a través de la expresión de genes antiapoptóticos; por otro lado, puede contribuir a la neurodegeneración a través de la expresión de citoquinas proinflamatorias y moléculas proapoptóticas (Memet, 2006; Liu *et al.*, 2012a). Además, NF- κ B está implicado en la plasticidad sináptica así como en el aprendizaje y la formación de memoria (Liu *et al.*, 2012a).

NF- κ B participa en los mecanismos patológicos que subyacen a las alteraciones cognitivas causadas por el Alzheimer, la encefalopatía diabética, la demencia vascular y la demencia alcohólica (Liu *et al.*, 2012a).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo a partir de la inmunofluorescencia de NF- κ B en el Giro Dentado del hipocampo muestran un aumento estadísticamente significativo de las células NF- κ B positivas a las 12 semanas de diabetes, comparado con su grupo control (tabla 5, figuras 12 y 13). Al comparar los grupos control y diabético 4 semanas, se aprecia un aumento del marcaje de NF- κ B en el hipocampo diabético, pero no es estadísticamente significativo. Asimismo, el tratamiento con insulina disminuye las células NF- κ B positivas, aunque no las devuelve a valores control sino a valores intermedios entre el grupo control y diabético de 12 semanas. Resultados similares han sido descritos por otros autores donde observaron que el aumento en la expresión de NF- κ B inducido por la diabetes se restableció por un tratamiento combinado de insulina y el antioxidante tocotrienol (Kuhad *et al.*, 2009), o por el péptido C (Sima *et al.*, 2009a).

Se ha descrito en numerosos estudios un aumento de la activación de NF- κ B en otras complicaciones de la diabetes como la retinopatía (Kowluru *et al.*, 2003), nefropatía (Nam *et al.*, 2008), neuropatía (Kumar *et al.*, 2012), lesiones vasculares (You *et al.*, 2010), etc. Por lo que parece que esta activación de NF- κ B es un mecanismo común implicado en las diversas complicaciones de la diabetes.

Como se ha mencionado anteriormente, NF- κ B participa en la transcripción de numerosos genes involucrados en múltiples respuestas, pero la bibliografía existente parece indicar que la implicación de NF- κ B en la encefalopatía diabética es a través de:

- a) El estrés oxidativo y su relación con la cascada inflamatoria: El estrés oxidativo activa a factores de transcripción que son sensibles a cambios

redox, como es el caso de NF- κ B (Schreck *et al.*, 1991), y esto conlleva la producción de citoquinas proinflamatorias y quimoquinas (Sozzani *et al.*, 2005). Los ROS participan en la fisiopatología de varias alteraciones asociadas con la inflamación (Chen & Kunsch, 2004), como podría ser el caso de la encefalopatía diabética.

- b) Apoptosis: La activación de NF- κ B por la hiperglucemia también induce apoptosis en neuronas (Mattson & Meffert, 2006).

Además, se ha descrito en animales diabéticos que la activación de la señalización de NF- κ B causa disrupción y falta de retención de memoria en la tarea del laberinto de agua de Morris (Liu *et al.*, 2012a).

4.2. CREB Y pCREB

La interacción entre los AGEs y sus receptores (RAGEs) estimula diversidad de cascadas de señalización que convergen en múltiples factores de transcripción, entre ellos CREB (Huttunen *et al.*, 2002). CREB está implicado en la activación de la síntesis de proteínas necesarias para la formación de la memoria a largo plazo (Ishige *et al.*, 1999; Lamprecht *et al.*, 1997; Lamprecht & Dudai, 1996). La interrupción en la ruta de fosforilación de CREB perjudica habilidades cognitivas y aspectos del comportamiento asociados con el sistema nervioso central. Asimismo, se han implicado alteraciones en la transcripción de genes mediadas por CREB en múltiples desórdenes psiquiátricos como la depresión, la ansiedad, la adicción y déficits cognitivos (Mayr & Montminy, 2001).

Varios autores describen en sus estudios una disminución, tanto en la expresión como en los niveles de proteína, de CREB y pCREB en modelos experimentales de encefalopatía diabética (Francis *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2011), que va acompañada de un descenso en la expresión y niveles de BDNF. La expresión de BDNF está controlada por CREB (Warburton *et al.*, 2005). Además, BDNF es un factor de crecimiento neuroprotector ya que es necesario para la proliferación (Kato-Semba *et al.*, 2002), supervivencia (Sairanen *et al.*, 2005) y plasticidad sináptica de las neuronas del Giro Dentado (Bramham & Messaoudi, 2005). Es por ello por lo que se asocia la disminución de CREB, pCREB y BDNF con la patogénesis de la encefalopatía diabética (Ma *et al.*, 2011).

Los resultados de este trabajo respecto al marcaje de CREB y pCREB en el Giro Dentado del hipocampo no coinciden con los esperados y con la bibliografía anteriormente citada (Francis *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2011) ya que no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos estudiados (tablas 6 y 7, figuras 14 a 17). En el caso de CREB, las medias de los diferentes grupos son muy similares entre sí (tabla 6); sin embargo, en el recuento de pCREB se aprecia una tendencia a la disminución de las células pCREB positivas en los grupos diabéticos respecto a sus controles y al tratado con insulina (tabla 7), aunque no es estadísticamente significativa. Quizás, un aumento del tamaño muestral hubiera permitido detectar diferencias estadísticamente significativas donde sólo se observa una tendencia.

La alteración en la señalización de la insulina actúa de manera desfavorable sobre la expresión y translocación de varios factores de transcripción, como el NF- κ B, CREB y GSK-3 β , que ejercen efectos sobre factores proinflamatorios y apoptóticos (Li *et al.*, 2001; Francis *et al.*, 2008; Sima *et al.*, 2004). Además, dado que CREB y NF- κ B están involucrados en la formación de memoria y en la plasticidad sináptica (Bourtchuladze *et al.*, 1994; Kandel, 2001; Lopez de Armentia *et al.*, 2007; Meffert *et al.*, 2003), es interesante estudiar si existe una conexión entre ambos factores de transcripción en este modelo de encefalopatía diabética. En este trabajo se muestra dicha conexión entre NF- κ B y CREB puesto que existe una correlación negativa estadísticamente significativa (figura 23) entre ambos factores de transcripción. De hecho, Kaltschmidt *et al.* sugirieron la existencia de una nueva cascada transcripcional donde NF- κ B podría controlar la ruta de CREB por medio de la expresión de la PKA (una de las quinasas que fosforila a CREB) (Kaltschmidt *et al.*, 2006).

4.3. Nrf2

Recientemente está surgiendo la idea de que Nrf2 es una diana importante en la diabetes y sus complicaciones (Zheng *et al.*, 2011). Dada la implicación del estrés oxidativo y la inflamación en la diabetes, y la habilidad de Nrf2 para potenciar la defensa antioxidante de la célula y protegerla frente a la producción dañina de intermediarios de la inflamación, es lógico pensar que la expresión o función de Nrf2 pueda estar alterada en la diabetes.

Resultados experimentales muestran una disminución en la expresión de Nrf2 en el nervio ciático de animales diabéticos, comparado con sus controles (Negi *et al.*, 2011), así como en la nefropatía diabética (Palsamy & Subramanian, 2011). Sin embargo, los resultados de este trabajo en cuanto a la expresión de Nrf2 en el Giro Dentado del hipocampo no son los esperados ya que no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos estudiados (tabla 8, figuras 18 y 19). Cabría esperar en este modelo experimental de encefalopatía diabética, que además de las alteraciones observadas en los parámetros indicadores de estrés oxidativo (aumento del MDA y disminución del GSH), se observase una disminución del marcaje nuclear de Nrf2 en el hipocampo de las ratas diabéticas (la ubicación nuclear de este factor de transcripción indica que es activo). Kumar *et al.* sí obtienen estos resultados en los que se da un aumento del MDA, disminución del GSH, sobreexpresión de NF- κ B y citoquinas proinflamatorias junto con una disminución de la expresión de Nrf2 en un modelo de neuropatía diabética (Kumar *et al.*, 2012).

Varios autores han propuesto diversas evidencias a favor de la existencia de una conexión entre Nrf2 y NF- κ B, entre ellas:

- La variedad de agentes antiinflamatorios y anticarcinogénicos que actúan suprimiendo la señalización de NF- κ B y activando la de Nrf2 (Balogun *et al.*, 2003; Surh, 2003; Chen *et al.*, 2005), además de las funciones opuestas que desempeñan ambos factores de transcripción en los procesos patológicos de inflamación y cáncer.
- Los múltiples estímulos patológicos que activan ambas rutas de señalización (Lan *et al.*, 1994; Ahn & Aggarwal, 2005; Anwar *et al.*, 2005).
- El hecho de que NF- κ B sea regulado por el estado redox (Sozzani *et al.*, 2005) y el papel fundamental que desempeña Nrf2 en el equilibrio redox de la célula.
- El hallazgo de que la subunidad p65 de NF- κ B actúa como antagonista de la actividad transcripcional de Nrf2 en la ruta Nrf2-ARE (Liu *et al.*, 2008).
- También se ha demostrado que algunos genes diana sobre los que actúa Nrf2 tienen sitios potenciales de unión para NF- κ B y sus promotores (Nho & O'Dwyer, 2004).

Además de la conexión entre Nrf2 y NF- κ B, Chen *et al.* han descrito recientemente que Nrf2 interacciona con el inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas p21. Parece que p21 se une a unas secuencias específicas de Nrf2 y lo estabiliza, proporcionando protección frente al estrés oxidativo, aunque el mecanismo exacto debe ser elucidado (Chen *et al.*, 2009). Este trabajo aporta una evidencia a favor de la relación entre Nrf2 y p21, en la correlación positiva y estadísticamente significativa entre ambas moléculas que se observa en la figura 21. Esta correlación pone de manifiesto que en una situación en la que se ha demostrado la existencia de estrés oxidativo (mediante los parámetros indicadores de estrés oxidativo, la hiperglucemia, etc.), p21 y Nrf2 pueden interactuar en una unión directa.

4.4. p21

p21 es un inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas (CDKIs) que actúa en la fase G1 del ciclo, retrasando o bloqueando la progresión de la célula hacia la fase S (Sherr & Roberts, 1999). p21 mantiene la célula quiescente, y su activación crónica llevaría a la célula a la detención del crecimiento y senescencia (Sherr & Roberts, 1999; Sharpless & DePinho, 2004). Por el contrario, la inhibición de p21 aumenta la proliferación celular (Gartel & Radhakrishnan, 2005).

Diversos estudios muestran que p21 tiene otras funciones además de la regulación del ciclo celular, como es la inhibición o mediación de la apoptosis en varias líneas tumorales (Gartel & Tyner, 2002; Fujiwara *et al.*, 2008) y la regulación de la proliferación neuronal en el hipocampo adulto (Pechnick *et al.*, 2008). Durante la apoptosis, la célula sale del ciclo celular e inicia la apoptosis antes de entrar en la fase S (que es el punto del ciclo celular que está negativamente regulado por p21). Además, p21 citoplásmico se une a la procaspasa-3 y evita la activación de las caspasas (Suzuki *et al.*, 1998).

Apenas existe literatura referente a la relación entre p21 y diabetes, sin embargo, esta relación parece estar mediada por el estrés oxidativo, ya que se sabe que p21 se sobreexpresa en respuesta al estrés oxidativo para promover la supervivencia celular (Esposito *et al.*, 1998; O'Reilly *et al.*, 2001; Poon & Hunter, 1998). Algunos autores han descrito la implicación de p21 y otros inhibidores de CDK en eventos del proceso patogénico de la nefropatía diabética como es la proliferación inicial de las células mesangiales y la posterior hipertrofia glomerular (Danesh *et al.*, 2002; Wolf, 2000;

Kuan *et al.*, 1998). También se ha estudiado el papel de p21 en la disfunción de las células β del páncreas y su relación con el estrés oxidativo y la hiperglucemia (Kaneto *et al.*, 1999).

Respecto a la implicación de p21 en la encefalopatía diabética, no se han encontrado publicaciones al respecto, por lo que este trabajo parece ser pionero en la búsqueda de la conexión existente. Sin embargo, los resultados observados respecto al marcaje de p21 en el Giro Dentado del hipocampo de este modelo experimental no parecen ser satisfactorios del todo, ya que no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos controles y diabéticos (tabla 9, figuras 20 y 21).

Por otro lado, resulta llamativo el hecho de que el grupo tratado con insulina sea significativamente diferente respecto a los otros grupos (duplica la media de los demás grupos). Esta observación podría explicarse a través de la proteína de unión al factor de crecimiento insulínico 3 (IGFBP-3). Como se mencionó con anterioridad en el apartado de la introducción, IGFBP-3 es un miembro de la familia de las proteínas de unión al factor de crecimiento insulínico (IGFBPs), que junto con los IGFs y sus receptores, forman parte de la cascada de señalización del IGF (factor de crecimiento insulínico). Mientras algunos autores defienden que IGFBP-3 disminuye en el suero de pacientes diabéticos con un control glucémico pobre y que el tratamiento con insulina lo devuelve a valores control (Akinci *et al.*, 2000), White *et al.* describieron que IGFBP-3 no aumenta en cerdos diabéticos, pero que el tratamiento con insulina da lugar a que se dupliquen las concentraciones en suero con respecto a los controles (White *et al.*, 1993). Además, Wu *et al.* muestran en su estudio que IGFBP-3 induce una disminución en la expresión de la ciclina E1 y un aumento de p21 en varias líneas celulares tumorales, y proponen que a través de estos efectos sobre la ciclina E1 y p21 tenga lugar el bloqueo de la célula en la fase G1, mediado por IGFBP-3 (Wu *et al.*, 2013). Con estas referencias podemos proponer una explicación al aumento de la expresión de p21 en el hipocampo del grupo tratado con insulina: la insulina aumentaría la concentración de IGFBP-3, e IGFBP-3 aumentaría los niveles de p21.

5. MECANISMOS IMPLICADOS EN LOS DÉFICITS DE APRENDIZAJE Y MEMORIA ESPACIAL

En el hipocampo ocurren cambios en la intensidad de las sinapsis entre los grupos de neuronas que son críticos para ciertos tipos de aprendizaje y memoria. El Giro Dentado del hipocampo desempeña un papel fundamental en el aprendizaje y memoria espacial. En el Giro Dentado, la regulación de la conectividad sináptica se extiende desde cambios en el número e intensidad de la sinapsis (la potenciación a largo plazo, PLP, consiste en una potenciación de la intensidad de la sinapsis y la depresión a largo plazo, DLP, en una reducción de dicha intensidad), hasta la adición de nuevas neuronas en la edad adulta (Leuner *et al.*, 2006).

Se han descrito alteraciones en el aprendizaje y memoria espacial en modelos animales de diabetes del tipo 1 y 2 (Stranahan *et al.*, 2008; Jackson-Guilford *et al.*, 2000; Kamal *et al.*, 2000). Estas alteraciones, puestas de manifiesto en el test del laberinto de agua de Morris, se han asociado con alteraciones en la plasticidad sináptica (medido como PLP) (Biessels *et al.*, 1996; Stranahan *et al.*, 2008), proliferación y supervivencia neuronal (Stranahan *et al.*, 2008).

Los cambios en la organización y función sináptica observados en el hipocampo diabético parecen ser el resultado, al menos en parte, de los cambios inducidos por la hiperglucemia sobre la homeostasis de la concentración de Ca^{2+} intracelular (Biessels *et al.*, 2002; Holscher, 1997). En la diabetes crónica, la homeostasis del calcio neuronal sufre un desajuste progresivo que favorece el aumento de DLP y disminuye la PLP (Kamal *et al.*, 1999). Además, el desajuste en la homeostasis del calcio neuronal que se produce por la diabetes puede contribuir a la degeneración neuronal (Biessels *et al.*, 2002; Holscher, 1997).

Sin embargo, Sima *et al.* defienden que más que por la hiperglucemia, los déficits cognitivos tempranos asociados a la diabetes tipo 1 se deben principalmente a la alteración en la ruta de señalización de la insulina, y como consecuencia, a la afectación que ésta tiene sobre la expresión de factores neurotróficos, neurotransmisores, estrés oxidativo y apoptosis. Todo ello resulta en alteraciones sobre la integridad neuronal y las sinapsis que se establecen de manera habitual en el desarrollo del cerebro (Sima, 2010). Esta afirmación la apoyan sobre numerosos resultados experimentales en los que

observaron que tras la administración del péptido C (como agente mimético de la insulina que estimula su señalización y no afecta a la hiperglucemia) desde el inicio de la diabetes se prevenían completamente los déficits comportamentales y la alteración en la expresión de los factores neurotróficos del hipocampo (Sima *et al.*, 2009b; Sima & Li, 2005).

Además de la insulina, factores de transcripción como CREB participan en la regulación de la expresión de genes que codifican para factores de crecimiento, como es el caso de la regulación de BDNF por CREB (Warburton *et al.*, 2005). Se sabe que la disminución de BDNF afecta a la función del Giro Dentado, lo cual resulta en déficits cognitivos (Witgen *et al.*, 2005) y de memoria (Bartesaghi, 2004). Como se ha descrito anteriormente, tanto CREB como NF- κ B participan en la formación de memoria y en la plasticidad sináptica (Bourtchuladze *et al.*, 1994). Diversos autores han descrito que la alteración de estos dos factores de transcripción por la diabetes está implicada en la disrupción y en la falta de retención de memoria en el test del laberinto de agua de Morris (Kuhad *et al.*, 2009; Francis *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2011).

El test del laberinto de agua de Morris es el test más utilizado para investigar aspectos específicos de la memoria espacial. El parámetro que se ha empleado para evaluar la memoria espacial de las ratas es la latencia acumulada del test, es decir, el tiempo que tardan en encontrar la plataforma escondida a lo largo de la duración del test (3 días y 3 pases por día). En la tabla 10 de los resultados se observa que no existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el diabético a las 4 semanas pero sí existen diferencias a las 12 semanas. Además, se observa que el tratamiento con insulina previene el aumento significativo de latencia acumulada en el test (tabla 10, figura 25). La bibliografía existente apoya estos datos (Biessels *et al.*, 1996; Kamal *et al.*, 2000; Kuhad *et al.*, 2009; Francis *et al.*, 2008). Biessels *et al.* observaron que el déficit en PLP es el resultado de un proceso progresivo y se corresponde con el déficit en el aprendizaje de ratas diabéticas en las que después de 4 semanas de diabetes no observaron déficits de aprendizaje, mientras que después de 12 semanas los déficits en el aprendizaje eran significativos (Biessels *et al.*, 1996). También observaron en otro estudio que el tratamiento con insulina, mediante la implantación de “pellets” de insulina al comienzo de la diabetes, previno completamente los déficits de aprendizaje. Sin embargo, si el tratamiento con insulina

se posponía hasta diez semanas después de la inducción de la diabetes, cuando el aprendizaje ya estaba alterado, la mejora era sólo parcial (Biessels *et al.*, 1998).

Recapitulando, podemos proponer que todos los cambios moleculares que se han estudiado en el presente modelo experimental de encefalopatía diabética pueden relacionarse de una forma u otra con los déficits en el aprendizaje y memoria espacial observados. El aumento en los parámetros indicadores de estrés oxidativo (aumento de MDA y disminución de GSH), la disminución de la proliferación en la SGZ y las alteraciones en la expresión de los diversos factores de transcripción (aumento en NF- κ B y tendencia a la disminución de pCREB), coinciden con los resultados obtenidos por otros autores y que se han propuesto como posibles mecanismos implicados en la encefalopatía diabética (Fukui *et al.*, 2001; Stranahan *et al.*, 2008; Kuhad *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2011). De hecho, podemos establecer una clara conexión entre la proliferación en la SGZ del Giro Dentado y el aprendizaje y la memoria espacial en la correlación que se muestra en la figura 26; donde se observa que la latencia acumulada del laberinto de agua de Morris y el número de células BrdU positivas de la SGZ se correlacionan negativamente (a medida que aumenta el marcaje de BrdU y por tanto la proliferación, disminuye la latencia acumulada del test, es decir, el tiempo en realizar la tarea y supone una mejora de la memoria espacial). Además, los resultados de este trabajo también presentan evidencias a favor de la relación existente entre pCREB y el aprendizaje y la memoria en la correlación que se muestra en la figura 27; donde se observa que a medida que aumenta el número de células pCREB positivas, disminuye la latencia acumulada del laberinto de agua de Morris (recordemos que pCREB es la forma activa del factor de transcripción y está implicado en la plasticidad sináptica y la formación de memoria).



CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en el presente trabajo, podemos concluir que existen alteraciones funcionales y moleculares en el hipocampo de un modelo experimental de diabetes, y siguen una progresión temporal. El tratamiento con insulina desde el inicio de la diabetes previene dichas alteraciones. Concretamente:

1. Se observan cambios estadísticamente significativos en los parámetros indicadores de estrés oxidativo (disminución de la concentración de GSH y aumento de la concentración de MDA) en el hipocampo de ratas diabéticas a las 12 semanas de diabetes, mientras que a las 4 semanas no existen dichos cambios.
2. La proliferación neuronal en la SGZ del Giro Dentado del modelo experimental disminuye de forma significativa a las 12 semanas y no a las 4 semanas desde la inducción de la diabetes.
3. La expresión del factor de transcripción NF- κ B en el Giro Dentado del hipocampo está aumentado en el grupo diabético de 12 semanas, mientras que a las 4 semanas dicho aumento no es estadísticamente significativo. El resto de factores de transcripción estudiados (Nrf2, p21, CREB y pCREB) no presentan diferencias significativas, aunque sí se han observado correlaciones interesantes en las que están implicados.
4. El tiempo necesario para alcanzar la plataforma en el laberinto de agua de Morris (como medida para evaluar el aprendizaje y la memoria espacial) aumenta de forma significativa a las 12 semanas de diabetes, pero no a las 4 semanas.



BIBLIOGRAFÍA

- Anónimo (2010). Acetyl-L-carnitine. Monograph. *Altern Med Rev* **15**, 76-83.
- Ahn, K. S., and Aggarwal, B. B. (2005). Transcription factor NF-kappaB: a sensor for smoke and stress signals. *Ann N Y Acad Sci* **1056**, 218-233.
- Akinci, A., Copeland, K. C., Garmong, A., and Clemmons, D. R. (2000). Insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) in serum and urine and IGFBP-2 protease activity in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* **49**, 626-633.
- Altman, J. (1963). Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *Anat Rec* **145**, 573-591.
- Altman, J. (1969). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol* **137**, 433-457.
- Altman, J., and Das, G. D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* **124**, 319-335.
- Alvarez-Nölting, R., Arnal, E., Barcia, J. M., Miranda, M., and Romero, F. J. (2011). Protection by DHA of early hippocampal changes in diabetes: possible role of CREB and NF-kappaB. *Neurochem Res* **37**, 105-115.
- Allen, E. (1912). The cessation of the mitosis in the central nervous system of the albino rat. *J Comp Neurol* **22**, 547-568.
- Amaral, D. G. (1978). A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *J Comp Neurol* **182**, 851-914.
- Amaral, D. G., and Witter, M. P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* **31**, 571-591.
- Anwar, A. A., Li, F. Y., Leake, D. S., Ishii, T., Mann, G. E., and Siow, R. C. (2005). Induction of heme oxygenase 1 by moderately oxidized low-density lipoproteins in human vascular smooth muscle cells: role of mitogen-activated protein kinases and Nrf2. *Free Radic Biol Med* **39**, 227-236.
- Aragno, M., Mastrocola, R., Brignardello, E., Catalano, M., Robino, G., Manti, R., Parola, M., Danni, O., and Boccuzzi, G. (2002). Dehydroepiandrosterone modulates nuclear factor-kappaB activation in hippocampus of diabetic rats. *Endocrinology* **143**, 3250-8.
- Arnal, E., Miranda, M., Johnsen-Soriano, S., Alvarez-Nolting, R., Diaz-Llopis, M., Araiz, J., Cervera, E., Bosch-Morell, F., and Romero, F. J. (2009). Beneficial effect of docosahexanoic acid and lutein on retinal structural, metabolic, and functional abnormalities in diabetic rats. *Curr Eye Res* **34**, 928-938.
- American Diabetes Association (2010). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* **33 Suppl 1**, S62-69.
- Asvold, B. O., Sand, T., Hestad, K., and Bjorgaas, M. R. (2010). Cognitive function in type 1 diabetic adults with early exposure to severe hypoglycemia: a 16-year follow-up study. *Diabetes Care* **33**, 1945-1947.
- Ates, O., Cayli, S. R., Altinoz, E., Yucel, N., Kocak, A., Tarim, O., Durak, A., Turkoz, Y., and Yologlu, S. (2006). Neuroprotective effect of mexiletine in the central nervous system of diabetic rats. *Mol Cell Biochem* **286**, 125-131.
- Ates, O., Cayli, S. R., Yucel, N., Altinoz, E., Kocak, A., Durak, M. A., Turkoz, Y., and Yologlu, S. (2007). Central nervous system protection by resveratrol in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Clin Neurosci* **14**, 256-260.
- Auer, R. N. (2004). Hypoglycemic brain damage. *Metab Brain Dis* **19**, 169-175.

- Awad, N., Gagnon, M., and Messier, C. (2004). The relationship between impaired glucose tolerance, type 2 diabetes, and cognitive function. *J Clin Exp Neuropsychol* **26**, 1044-1080.
- Aye, T., Reiss, A. L., Kesler, S., Hoang, S., Drobny, J., Park, Y., Schleifer, K., Baumgartner, H., Wilson, D. M., and Buckingham, B. A. (2011). The feasibility of detecting neuropsychologic and neuroanatomic effects of type 1 diabetes in young children. *Diabetes Care* **34**, 1458-1462.
- Baeuerle, P. A., and Henkel, T. (1994). Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* **12**, 141-179.
- Bailey, C. H., Bartsch, D., and Kandel, E. R. (1996). Toward a molecular definition of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13445-13452.
- Baldwin, A. S., Jr (1996). The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* **14**, 649-683.
- Balogun, E., Hoque, M., Gong, P., Killeen, E., Green, C. J., Foresti, R., Alam, J., and Motterlini, R. (2003). Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. *Biochem J* **371**, 887-895.
- Balu, D. T., and Lucki, I. (2009). Adult hippocampal neurogenesis: regulation, functional implications, and contribution to disease pathology. *Neurosci Biobehav Rev* **33**, 232-252.
- Barkett, M., and Gilmore, T. D. (1999). Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* **18**, 6910-6924.
- Bartesaghi, R. (2004). Effect of early isolation on the synaptic function in the dentate gyrus and field CA1 of the guinea pig. *Hippocampus* **14**, 482-498.
- Baydas, G., Sonkaya, E., Tuzcu, M., Yasar, A., and Donder, E. (2005). Novel role for gabapentin in neuroprotection of central nervous system in streptozotocine-induced diabetic rats. *Acta Pharmacol Sin* **26**, 417-422.
- Beauquis, J., Roig, P., Homo-Delarche, F., De Nicola, A., and Saravia, F. (2006). Reduced hippocampal neurogenesis and number of hilar neurones in streptozotocin-induced diabetic mice: reversion by antidepressant treatment. *Eur J Neurosci* **23**, 1539-1546.
- Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., and Freeman, B. A. (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 1620-1624.
- Berr, C., Balansard, B., Arnaud, J., Roussel, A. M., and Alperovitch, A. (2000). Cognitive decline is associated with systemic oxidative stress: the EVA study. Etude du Vieillissement Arteriel. *J Am Geriatr Soc* **48**, 1285-1291.
- Bierhaus, A., Schiekofler, S., Schwaninger, M., Andrassy, M., Humpert, P. M., Chen, J., Hong, M., Luther, T., Henle, T., Kloting, I., Morcos, M., Hofmann, M., Tritschler, H., Weigle, B., Kasper, M., Smith, M., Perry, G., Schmidt, A. M., Stern, D. M., Haring, H. U., Schleicher, E., and Nawroth, P. P. (2001). Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB. *Diabetes* **50**, 2792-2808.
- Biessels, G. J., Kamal, A., Ramakers, G. M., Urban, I. J., Spruijt, B. M., Erkelens, D. W., and Gispen, W. H. (1996). Place learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* **45**, 1259-1266.
- Biessels, G. J., Kamal, A., Urban, I. J., Spruijt, B. M., Erkelens, D. W., and Gispen, W. H. (1998). Water maze learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin treatment. *Brain Res* **800**, 125-135.

- Biessels, G. J., van der Heide, L. P., Kamal, A., Bleys, R. L., and Gispen, W. H. (2002). Ageing and diabetes: implications for brain function. *Eur J Pharmacol* **441**, 1-14.
- Bindokas, V. P., Jordan, J., Lee, C. C., and Miller, R. J. (1996). Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *J Neurosci* **16**, 1324-1336.
- Bliss, T. V., and Collingridge, G. L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **361**, 31-39.
- Bloch-Damti, A., and Bashan, N. (2005). Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* **7**, 1553-1567.
- Blondeau, N., Widmann, C., Lazdunski, M., and Heurteaux, C. (2001). Activation of the nuclear factor-kappaB is a key event in brain tolerance. *J Neurosci* **21**, 4668-4677.
- Bourbon, A., Vionnet, M., Leprince, P., Vaissier, E., Copeland, J., McDonagh, P., Debre, P., and Gandjbakhch, I. (2004). The effect of methylprednisolone treatment on the cardiopulmonary bypass-induced systemic inflammatory response. *Eur J Cardiothorac Surg* **26**, 932-938.
- Bourtchuladze, R., Frenguelli, B., Blendy, J., Cioffi, D., Schutz, G., and Silva, A. J. (1994). Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell* **79**, 59-68.
- Brambilla, R., Bracchi-Ricard, V., Hu, W. H., Frydel, B., Bramwell, A., Karmally, S., Green, E. J., and Bethea, J. R. (2005). Inhibition of astroglial nuclear factor kappaB reduces inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury. *J Exp Med* **202**, 145-156.
- Bramham, C. R., and Messaoudi, E. (2005). BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. *Prog Neurobiol* **76**, 99-125.
- Brands, A. M., Biessels, G. J., de Haan, E. H., Kappelle, L. J., and Kessels, R. P. (2005). The effects of type 1 diabetes on cognitive performance: a meta-analysis. *Diabetes Care* **28**, 726-735.
- Braun, S., Hanselmann, C., Gassmann, M. G., auf dem Keller, U., Born-Berclaz, C., Chan, K., Kan, Y. W., and Werner, S. (2002). Nrf2 transcription factor, a novel target of keratinocyte growth factor action which regulates gene expression and inflammation in the healing skin wound. *Mol Cell Biol* **22**, 5492-5505.
- Brismar, T., Hyllienmark, L., Ekberg, K., and Johansson, B. L. (2002). Loss of temporal lobe beta power in young adults with type 1 diabetes mellitus. *Neuroreport* **13**, 2469-2473.
- Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* **414**, 813-820.
- Brownlee, M. (2005). The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* **54**, 1615-1625.
- Bryan, H. K., Olayanju, A., Goldring, C. E., and Park, B. K. (2012). The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation. *Biochem Pharmacol* **85**, 705-717.
- Buttke, T. M., and Sandstrom, P. A. (1994). Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* **15**, 7-10.
- Byrne, J. H., and Kandel, E. R. (1996). Presynaptic facilitation revisited: state and time dependence. *J Neurosci* **16**, 425-435.
- Cameron, H. A., Woolley, C. S., McEwen, B. S., and Gould, E. (1993). Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* **56**, 337-344.

- Cassar, M., Jones, M. G., and Szatkowski, M. (1998). Reduced adenosine uptake accelerates ischaemic block of population spikes in hippocampal slices from streptozotocin-treated diabetic rats. *Eur J Neurosci* **10**, 239-245.
- Clemens, J. A., Stephenson, D. T., Smalstig, E. B., Dixon, E. P., and Little, S. P. (1997). Global ischemia activates nuclear factor-kappa B in forebrain neurons of rats. *Stroke* **28**, 1073-1081.
- Cojocaru, I. M., Cojocaru, M., Musuroi, C., Botezat, M., Lazar, L., and Druta, A. (2004). Lipid peroxidation and catalase in diabetes mellitus with and without ischemic stroke. *Rom J Intern Med* **42**, 423-429.
- Convit, A. (2005). Links between cognitive impairment in insulin resistance: an explanatory model. *Neurobiol Aging* **26 Suppl 1**, 31-35.
- Convit, A., Wolf, O. T., Tarshish, C., and de Leon, M. J. (2003). Reduced glucose tolerance is associated with poor memory performance and hippocampal atrophy among normal elderly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2019-2022.
- Cook, A. L., Vitale, A. M., Ravishankar, S., Matigian, N., Sutherland, G. T., Shan, J., Sutharsan, R., Perry, C., Silburn, P. A., Mellick, G. D., Whitelaw, M. L., Wells, C. A., Mackay-Sim, A., and Wood, S. A. (2011). NRF2 activation restores disease related metabolic deficiencies in olfactory neurosphere-derived cells from patients with sporadic Parkinson's disease. *PLoS One* **6**, e21907.
- Craft, S. (2007). Insulin resistance and Alzheimer's disease pathogenesis: potential mechanisms and implications for treatment. *Curr Alzheimer Res* **4**, 147-152.
- Chambers, D. E., Parks, D. A., Patterson, G., Roy, R., McCord, J. M., Yoshida, S., Parmley, L. F., and Downey, J. M. (1985). Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol* **17**, 145-152.
- Cheng, C. M., Cohen, M., Tseng, V., and Bondy, C. A. (2001). Endogenous IGF1 enhances cell survival in the postnatal dentate gyrus. *J Neurosci Res* **64**, 341-347.
- Chen, C. Y., Jang, J. H., Li, M. H., and Surh, Y. J. (2005). Resveratrol upregulates heme oxygenase-1 expression via activation of NF-E2-related factor 2 in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **331**, 993-1000.
- Chen, W., Sun, Z., Wang, X. J., Jiang, T., Huang, Z., Fang, D., and Zhang, D. D. (2009). Direct interaction between Nrf2 and p21(Cip1/WAF1) upregulates the Nrf2-mediated antioxidant response. *Mol Cell* **34**, 663-673.
- Chen, X. L., Dodd, G., Thomas, S., Zhang, X., Wasserman, M. A., Rovin, B. H., and Kunsch, C. (2006). Activation of Nrf2/ARE pathway protects endothelial cells from oxidant injury and inhibits inflammatory gene expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **290**, H1862-1870.
- Chen, X. L., and Kunsch, C. (2004). Induction of cytoprotective genes through Nrf2/antioxidant response element pathway: a new therapeutic approach for the treatment of inflammatory diseases. *Curr Pharm Des* **10**, 879-891.
- Chucair, A. J., Rotstein, N. P., Sangiovanni, J. P., During, A., Chew, E. Y., and Politi, L. E. (2007). Lutein and zeaxanthin protect photoreceptors from apoptosis induced by oxidative stress: relation with docosahexaenoic acid. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48**, 5168-5177.
- Danesh, F. R., Sadeghi, M. M., Amro, N., Philips, C., Zeng, L., Lin, S., Sahai, A., and Kanwar, Y. S. (2002). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors prevent high glucose-induced proliferation of mesangial cells via modulation of Rho GTPase/p21 signaling pathway: Implications for diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 8301-8305.

- De Bresser, J., Tiehuis, A. M., van den Berg, E., Reijmer, Y. D., Jongen, C., Kappelle, L. J., Mali, W. P., Viergever, M. A., and Biessels, G. J. (2010). Progression of cerebral atrophy and white matter hyperintensities in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* **33**, 1309-1314.
- Deary, I. J., Crawford, J. R., Hepburn, D. A., Langan, S. J., Blackmore, L. M., and Frier, B. M. (1993). Severe hypoglycemia and intelligence in adult patients with insulin-treated diabetes. *Diabetes* **42**, 341-344.
- Denis-Donini, S., Dellarole, A., Crociara, P., Francese, M. T., Bortolotto, V., Quadrato, G., Canonico, P. L., Orsetti, M., Ghi, P., Memo, M., Bonini, S. A., Ferrari-Toninelli, G., and Grilli, M. (2008). Impaired adult neurogenesis associated with short-term memory defects in NF-kappaB p50-deficient mice. *J Neurosci* **28**, 3911-3919.
- Devi, T. S., Singh, L. P., Hosoya, K., and Terasaki, T. (2011). GSK-3beta/CREB axis mediates IGF-1-induced ECM/adhesion molecule expression, cell cycle progression and monolayer permeability in retinal capillary endothelial cells: implications for diabetic retinopathy. *Biochim Biophys Acta* **1812**, 1080-1088.
- Di Luca, M., Ruts, L., Gardoni, F., Cattabeni, F., Biessels, G. J., and Gispen, W. H. (1999). NMDA receptor subunits are modified transcriptionally and post-translationally in the brain of streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* **42**, 693-701.
- Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J. M., and Alvarez-Buylla, A. (1997). Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* **17**, 5046-5061.
- Dringen, R. (2000). Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol* **62**, 649-671.
- Duan, C., Ren, H., and Gao, S. (2010). Insulin-like growth factors (IGFs), IGF receptors, and IGF-binding proteins: roles in skeletal muscle growth and differentiation. *Gen Comp Endocrinol* **167**, 344-351.
- Duarte, A. I., Moreira, P. I., and Oliveira, C. R. (2012). Insulin in central nervous system: more than just a peripheral hormone. *J Aging Res* **2012**, 384017.
- El-Deiry, W. S., Harper, J. W., O'Connor, P. M., Velculescu, V. E., Canman, C. E., Jackman, J., Pietenpol, J. A., Burrell, M., Hill, D. E., Wang, Y., and et al. (1994). WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* **54**, 1169-1174.
- Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A., and Gage, F. H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* **4**, 1313-1317.
- Esposito, F., Cuccovillo, F., Russo, L., Casella, F., Russo, T., and Cimino, F. (1998). A new p21waf1/cip1 isoform is an early event of cell response to oxidative stress. *Cell Death Differ* **5**, 940-5.
- Fahey, R. C., Buschbacher, R. M., and Newton, G. L. (1987). The evolution of glutathione metabolism in phototrophic microorganisms. *J Mol Evol* **25**, 81-88.
- Farooqui, T. (2008). Iron-induced oxidative stress modulates olfactory learning and memory in honeybees. *Behav Neurosci* **122**, 433-447.
- Fazeli, S. A. (2009). Neuroprotection in diabetic encephalopathy. *Neurodegener Dis* **6**, 213-218.
- Fillebeen, C., and Pantopoulos, K. (2002). Redox control of iron regulatory proteins. *Redox Rep* **7**, 15-22.
- Francis, G. J., Martinez, J. A., Liu, W. Q., Xu, K., Ayer, A., Fine, J., Tuor, U. I., Glazner, G., Hanson, L. R., Frey, W. H., 2nd, and Toth, C. (2008). Intranasal

- insulin prevents cognitive decline, cerebral atrophy and white matter changes in murine type I diabetic encephalopathy. *Brain* **131**, 3311-3334.
- Fridmacher, V., Kaltschmidt, B., Goudeau, B., Ndiaye, D., Rossi, F. M., Pfeiffer, J., Kaltschmidt, C., Israel, A., and Memet, S. (2003). Forebrain-specific neuronal inhibition of nuclear factor-kappaB activity leads to loss of neuroprotection. *J Neurosci* **23**, 9403-9408.
- Fridovich, I. (1983). Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **23**, 239-257.
- Frolich, L., Blum-Degen, D., Bernstein, H. G., Engelsberger, S., Humrich, J., Laufer, S., Muschner, D., Thalheimer, A., Turk, A., Hoyer, S., Zochling, R., Boissl, K. W., Jellinger, K., and Riederer, P. (1998). Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. *J Neural Transm* **105**, 423-438.
- Fujiwara, K., Daido, S., Yamamoto, A., Kobayashi, R., Yokoyama, T., Aoki, H., Iwado, E., Shinojima, N., Kondo, Y., and Kondo, S. (2008). Pivotal role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 in apoptosis and autophagy. *J Biol Chem* **283**, 388-397.
- Fukui, K., Omoi, N. O., Hayasaka, T., Shinnkai, T., Suzuki, S., Abe, K., and Urano, S. (2002). Cognitive impairment of rats caused by oxidative stress and aging, and its prevention by vitamin E. *Ann N Y Acad Sci* **959**, 275-84.
- Fukui, K., Onodera, K., Shinkai, T., Suzuki, S., and Urano, S. (2001). Impairment of learning and memory in rats caused by oxidative stress and aging, and changes in antioxidative defense systems. *Ann N Y Acad Sci* **928**, 168-175.
- Gabig, T. G., and Babior, B. M. (1979). The O₂(-) -forming oxidase responsible for the respiratory burst in human neutrophils. Properties of the solubilized enzyme. *J Biol Chem* **254**, 9070-9074.
- Gagne, J., Milot, M., Gelinas, S., Lahsaini, A., Trudeau, F., Martinoli, M. G., and Massicotte, G. (1997). Binding properties of glutamate receptors in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Diabetes* **46**, 841-846.
- Gardoni, F., Kamal, A., Bellone, C., Biessels, G. J., Ramakers, G. M., Cattabeni, F., Gispen, W. H., and Di Luca, M. (2002). Effects of streptozotocin-diabetes on the hippocampal NMDA receptor complex in rats. *J Neurochem* **80**, 438-447.
- Gartel, A. L., and Radhakrishnan, S. K. (2005). Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. *Cancer Res* **65**, 3980-3985.
- Gartel, A. L., and Tyner, A. L. (1999). Transcriptional regulation of the p21(WAF1/CIP1) gene. *Exp Cell Res* **246**, 280-289.
- Gartel, A. L., and Tyner, A. L. (2002). The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther* **1**, 639-649.
- Georges, R. B., Adwan, H., Hamdi, H., Hielscher, T., Linnemann, U., and Berger, M. R. (2011). The insulin-like growth factor binding proteins 3 and 7 are associated with colorectal cancer and liver metastasis. *Cancer Biol Ther* **12**, 69-79.
- Gerozissis, K. (2003). Brain insulin: regulation, mechanisms of action and functions. *Cell Mol Neurobiol* **23**, 1-25.
- Gispen, W. H., and Biessels, G. J. (2000). Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends Neurosci* **23**, 542-549.
- Giugliano, D., Ceriello, A., and Paolisso, G. (1996). Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* **19**, 257-267.
- Gold, A. E., Deary, I. J., and Frier, B. M. (1993). Recurrent severe hypoglycaemia and cognitive function in type 1 diabetes. *Diabet Med* **10**, 503-508.

- Goldman, S. A., and Nottebohm, F. (1983). Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 2390-2394.
- Gould, E., Cameron, H. A., Daniels, D. C., Woolley, C. S., and McEwen, B. S. (1992). Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus. *J Neurosci* **12**, 3642-3650.
- Gould, E., Tanapat, P., McEwen, B. S., Flugge, G., and Fuchs, E. (1998). Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3168-3171.
- Gould, E., Tanapat, P., Rydel, T., and Hastings, N. (2000). Regulation of hippocampal neurogenesis in adulthood. *Biol Psychiatry* **48**, 715-720.
- Grillo, C. A., Piroli, G. G., Hendry, R. M., and Reagan, L. P. (2009). Insulin-stimulated translocation of GLUT4 to the plasma membrane in rat hippocampus is PI3-kinase dependent. *Brain Res* **1296**, 35-45.
- Grillo, C. A., Piroli, G. G., Rosell, D. R., Hoskin, E. K., McEwen, B. S., and Reagan, L. P. (2003). Region specific increases in oxidative stress and superoxide dismutase in the hippocampus of diabetic rats subjected to stress. *Neuroscience* **121**, 133-140.
- Grunberger, G., Qiang, X., Li, Z., Mathews, S. T., Sbrissa, D., Shisheva, A., and Sima, A. A. (2001). Molecular basis for the insulinomimetic effects of C-peptide. *Diabetologia* **44**, 1247-1257.
- Gupta, A., Tripathi, A. K., Tripathi, R. L., Madhu, S. V., and Banerjee, B. D. (2007). Advanced glycosylated end products-mediated activation of polymorphonuclear neutrophils in diabetes mellitus and associated oxidative stress. *Indian J Biochem Biophys* **44**, 373-378.
- Guyot, L. L., Diaz, F. G., O'Regan, M. H., Song, D., and Phillis, J. W. (2000). The effect of topical insulin on the release of excitotoxic and other amino acids from the rat cerebral cortex during streptozotocin-induced hyperglycemic ischemia. *Brain Res* **872**, 29-36.
- Guzowski, J. F., and McGaugh, J. L. (1997). Antisense oligodeoxynucleotide-mediated disruption of hippocampal cAMP response element binding protein levels impairs consolidation of memory for water maze training. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 2693-2698.
- Halliwell, B. (2000). Oxidative stress markers in human disease: application to diabetes and to evaluation of the effects of antioxidants. In "Antioxidants in Diabetes Management" (L. Packer, P. Rösen, H. J. Tritschler, G. L. King and A. Azzi, eds.), pp. 33-52. Marcel Dekker, New York.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. (1986). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* **246**, 501-514.
- Hammes, H. P., Federoff, H. J., and Brownlee, M. (1995). Nerve growth factor prevents both neuroretinal programmed cell death and capillary pathology in experimental diabetes. *Mol Med* **1**, 527-534.
- Hardy, K., and Hunt, N. H. (2004). Effects of a redox-active agent on lymphocyte activation and early gene expression patterns. *Free Radic Biol Med* **37**, 1550-1563.
- Hastings, N. B., and Gould, E. (1999). Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells. *J Comp Neurol* **413**, 146-154.
- Hawkins, C. L., and Davies, M. J. (2001). Generation and propagation of radical reactions on proteins. *Biochim Biophys Acta* **1504**, 196-219.

- Heine, V. M., Maslam, S., Zareno, J., Joels, M., and Lucassen, P. J. (2004). Suppressed proliferation and apoptotic changes in the rat dentate gyrus after acute and chronic stress are reversible. *Eur J Neurosci* **19**, 131-144.
- Hermenegildo, C., Raya, A., Roma, J., and Romero, F. J. (1993). Decreased glutathione peroxidase activity in sciatic nerve of alloxan-induced diabetic mice and its correlation with blood glucose levels. *Neurochem Res* **18**, 893-896.
- Hissa, M. N., D'Almeida, J. A., Cremasco, F., and de Bruin, V. M. (2002). Event related P300 potential in NIDDM patients without cognitive impairment and its relationship with previous hypoglycemic episodes. *Neuro Endocrinol Lett* **23**, 226-230.
- Holscher, C. (1997). Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity. *Trends Neurosci* **20**, 298-303.
- Hoyer, S. (1998). Is sporadic Alzheimer disease the brain type of non-insulin dependent diabetes mellitus? A challenging hypothesis. *J Neural Transm* **105**, 415-422.
- Hsu, W. M., Chen, S. S., Peng, C. H., Chen, C. F., Ko, Y. C., Tsai, D. C., Chou, C. K., Ho, L. L., Chiou, S. H., and Liu, J. H. (2003). Elevated nitric oxide level in aqueous humor of AIDS patients with cytomegalovirus retinitis. *Ophthalmologica* **217**, 298-301.
- Huang, W., Connor, E., Rosa, T. D., Muir, A., Schatz, D., Silverstein, J., Crockett, S., She, J. X., and Maclaren, N. K. (1996). Although DR3-DQB1*0201 may be associated with multiple component diseases of the autoimmune polyglandular syndromes, the human leukocyte antigen DR4-DQB1*0302 haplotype is implicated only in beta-cell autoimmunity. *J Clin Endocrinol Metab* **81**, 2559-2563.
- Huttunen, H. J., Kuja-Panula, J., and Rauvala, H. (2002). Receptor for advanced glycation end products (RAGE) signaling induces CREB-dependent chromogranin expression during neuronal differentiation. *J Biol Chem* **277**, 38635-38646.
- Imamura, Y., Sakamoto, S., Endo, T., Utsumi, T., Fuse, M., Suyama, T., Kawamura, K., Imamoto, T., Yano, K., Uzawa, K., Nihei, N., Suzuki, H., Mizokami, A., Ueda, T., Seki, N., Tanzawa, H., and Ichikawa, T. (2012). FOXA1 promotes tumor progression in prostate cancer via the insulin-like growth factor binding protein 3 pathway. *PLoS One* **7**, e42456.
- Innamorato, N. G., Rojo, A. I., Garcia-Yague, A. J., Yamamoto, M., de Ceballos, M. L., and Cuadrado, A. (2008). The transcription factor Nrf2 is a therapeutic target against brain inflammation. *J Immunol* **181**, 680-689.
- Inoguchi, T., Li, P., Umeda, F., Yu, H. Y., Kakimoto, M., Imamura, M., Aoki, T., Etoh, T., Hashimoto, T., Naruse, M., Sano, H., Utsumi, H., and Nawata, H. (2000). High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* **49**, 1939-1945.
- Insausti, R., and Amaral, D. G. (2012). Hippocampal Formation. In "The Human Nervous System" (J. K. Mai and G. Paxinos, eds.), Vol. **4**, pp. 897-942. Elsevier Inc., San Diego.
- Ishige, K., Ito, Y., and Fukuda, H. (1999). Cyclic AMP responsive element- and activator protein 1 DNA-binding activities in epilepsy model mice. *Yakugaku Zasshi* **119**, 510-518.
- Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J. D., and Yamamoto, M. (1999). Keap1 represses nuclear activation of antioxidant

- responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev* **13**, 76-86.
- Jackson-Guilford, J., Leander, J. D., and Nisenbaum, L. K. (2000). The effect of streptozotocin-induced diabetes on cell proliferation in the rat dentate gyrus. *Neurosci Lett* **293**, 91-94.
- Jacobson, A. M., Ryan, C. M., Cleary, P. A., Waberski, B. H., Weinger, K., Musen, G., and Dahms, W. (2011). Biomedical risk factors for decreased cognitive functioning in type 1 diabetes: an 18 year follow-up of the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) cohort. *Diabetologia* **54**, 245-255.
- Jain, S. K. (1989). Hyperglycemia can cause membrane lipid peroxidation and osmotic fragility in human red blood cells. *J Biol Chem* **264**, 21340-21345.
- Jogie-Brahim, S., Feldman, D., and Oh, Y. (2009). Unraveling insulin-like growth factor binding protein-3 actions in human disease. *Endocr Rev* **30**, 417-437.
- Johnson, P. C., Brendel, K., and Meezan, E. (1982). Thickened cerebral cortical capillary basement membranes in diabetics. *Arch Pathol Lab Med* **106**, 214-217.
- Jolival, C. G., Lee, C. A., Beiswenger, K. K., Smith, J. L., Orlov, M., Torrance, M. A., and Masliah, E. (2008). Defective insulin signaling pathway and increased glycogen synthase kinase-3 activity in the brain of diabetic mice: parallels with Alzheimer's disease and correction by insulin. *J Neurosci Res* **86**, 3265-3274.
- Jones, J. I., and Clemmons, D. R. (1995). Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* **16**, 3-34.
- Jongen, C., and Biessels, G. J. (2008). Structural brain imaging in diabetes: a methodological perspective. *Eur J Pharmacol* **585**, 208-218.
- Josselyn, S. A., Shi, C., Carlezon, W. A., Jr, Neve, R. L., Nestler, E. J., and Davis, M. (2001). Long-term memory is facilitated by cAMP response element-binding protein overexpression in the amygdala. *J Neurosci* **21**, 2404-2412.
- Junker, U., Jaggi, C., Bestetti, G., and Rossi, G. L. (1985). Basement membrane of hypothalamus and cortex capillaries from normotensive and spontaneously hypertensive rats with streptozotocin-induced diabetes. *Acta Neuropathol* **65**, 202-208.
- Junod, A., Lambert, A. E., Orci, L., Pictet, R., Gonet, A. E., and Renold, A. E. (1967). Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *Proc Soc Exp Biol Med* **126**, 201-205.
- Kaltschmidt, B., Ndiaye, D., Korte, M., Pothion, S., Arbibe, L., Prullage, M., Pfeiffer, J., Lindecke, A., Staiger, V., Israel, A., Kaltschmidt, C., and Memet, S. (2006). NF-kappaB regulates spatial memory formation and synaptic plasticity through protein kinase A/CREB signaling. *Mol Cell Biol* **26**, 2936-2946.
- Kamal, A., Biessels, G. J., Duis, S. E., and Gispen, W. H. (2000). Learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: interaction of diabetes and ageing. *Diabetologia* **43**, 500-506.
- Kamal, A., Biessels, G. J., Urban, I. J., and Gispen, W. H. (1999). Hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: impairment of long-term potentiation and facilitation of long-term depression. *Neuroscience* **90**, 737-745.
- Kamboj, S. S., Chopra, K., and Sandhir, R. (2008). Neuroprotective effect of N-acetylcysteine in the development of diabetic encephalopathy in streptozotocin-induced diabetes. *Metab Brain Dis* **23**, 427-443.
- Kandel, E. R. (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* **294**, 1030-1038.
- Kaneto, H., Kajimoto, Y., Fujitani, Y., Matsuoka, T., Sakamoto, K., Matsuhsa, M., Yamasaki, Y., and Hori, M. (1999). Oxidative stress induces p21 expression in

- pancreatic islet cells: possible implication in beta-cell dysfunction. *Diabetologia* **42**, 1093-1097.
- Kaplan, M. S., and Bell, D. H. (1984). Mitotic neuroblasts in the 9-day-old and 11-month-old rodent hippocampus. *J Neurosci* **4**, 1429-1441.
- Kaplan, M. S., and Hinds, J. W. (1977). Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* **197**, 1092-1094.
- Kas, J., and Blattna, J. (1986). Phospholipids in foodstuffs. *Acta Univ Carol Med (Praha)* **32**, 81-92.
- Kasahara, J., Fukunaga, K., and Miyamoto, E. (2001). Activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV in long term potentiation in the rat hippocampal CA1 region. *J Biol Chem* **276**, 24044-24050.
- Kaspar, J. W., Niture, S. K., and Jaiswal, A. K. (2009). Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic Biol Med* **47**, 1304-1309.
- Katoh-Semba, R., Asano, T., Ueda, H., Morishita, R., Takeuchi, I. K., Inaguma, Y., and Kato, K. (2002). Riluzole enhances expression of brain-derived neurotrophic factor with consequent proliferation of granule precursor cells in the rat hippocampus. *FASEB J* **16**, 1328-1330.
- Kauer, J. A., Malenka, R. C., and Nicoll, R. A. (1988). A persistent postsynaptic modification mediates long-term potentiation in the hippocampus. *Neuron* **1**, 911-917.
- Kempermann, G., Kuhn, H. G., and Gage, F. H. (1998). Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J Neurosci* **18**, 3206-3212.
- Kilpatrick, E. S., Rigby, A. S., and Atkin, S. L. (2006). The effect of glucose variability on the risk of microvascular complications in type 1 diabetes. *Diabetes Care* **29**, 1486-1490.
- Kim, H. S., Lee, W. J., Lee, S. W., Chae, H. W., Kim, D. H., and Oh, Y. (2010a). Insulin-like growth factor binding protein-3 induces G1 cell cycle arrest with inhibition of cyclin-dependent kinase 2 and 4 in MCF-7 human breast cancer cells. *Horm Metab Res* **42**, 165-172.
- Kim, J., Cha, Y. N., and Surh, Y. J. (2010b). A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders. *Mutat Res* **690**, 12-23.
- Klann, E. (1998). Cell-permeable scavengers of superoxide prevent long-term potentiation in hippocampal area CA1. *J Neurophysiol* **80**, 452-457.
- Klein, J. P., and Waxman, S. G. (2003). The brain in diabetes: molecular changes in neurons and their implications for end-organ damage. *Lancet Neurol* **2**, 548-554.
- Kobayashi, A., Kang, M. I., Okawa, H., Ohtsuji, M., Zenke, Y., Chiba, T., Igarashi, K., and Yamamoto, M. (2004). Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol* **24**, 7130-7139.
- Kobayashi, M., and Yamamoto, M. (2005). Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. *Antioxid Redox Signal* **7**, 385-394.
- Kodl, C. T., Franc, D. T., Rao, J. P., Anderson, F. S., Thomas, W., Mueller, B. A., Lim, K. O., and Seaquist, E. R. (2008). Diffusion tensor imaging identifies deficits in white matter microstructure in subjects with type 1 diabetes that correlate with reduced neurocognitive function. *Diabetes* **57**, 3083-3089.
- Kodl, C. T., and Seaquist, E. R. (2008). Cognitive dysfunction and diabetes mellitus. *Endocr Rev* **29**, 494-511.

- Koriyama, Y., Chiba, K., Yamazaki, M., Suzuki, H., Muramoto, K., and Kato, S. (2010). Long-acting genipin derivative protects retinal ganglion cells from oxidative stress models in vitro and in vivo through the Nrf2/antioxidant response element signaling pathway. *J Neurochem* **115**, 79-91.
- Kornack, D. R., and Rakic, P. (2001). Cell proliferation without neurogenesis in adult primate neocortex. *Science* **294**, 2127-2130.
- Kosower, N. S., and Kosower, E. M. (1978). The glutathione status of cells. *Int Rev Cytol* **54**, 109-160.
- Kowluru, R. A., Koppolu, P., Chakrabarti, S., and Chen, S. (2003). Diabetes-induced activation of nuclear transcriptional factor in the retina, and its inhibition by antioxidants. *Free Radic Res* **37**, 1169-80.
- Kowluru, R. A., and Odenbach, S. (2004). Role of interleukin-1beta in the development of retinopathy in rats: effect of antioxidants. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**, 4161-4166.
- Kramer, L., Fasching, P., Madl, C., Schneider, B., Damjancic, P., Waldhausl, W., Irsigler, K., and Grimm, G. (1998). Previous episodes of hypoglycemic coma are not associated with permanent cognitive brain dysfunction in IDDM patients on intensive insulin treatment. *Diabetes* **47**, 1909-1914.
- Kuan, C. J., al-Douahji, M., and Shankland, S. J. (1998). The cyclin kinase inhibitor p21WAF1, CIP1 is increased in experimental diabetic nephropathy: potential role in glomerular hypertrophy. *J Am Soc Nephrol* **9**, 986-993.
- Kuhad, A., Bishnoi, M., Tiwari, V., and Chopra, K. (2009). Suppression of NF-kappabeta signaling pathway by tocotrienol can prevent diabetes associated cognitive deficits. *Pharmacol Biochem Behav* **92**, 251-259.
- Kuhad, A., and Chopra, K. (2007). Curcumin attenuates diabetic encephalopathy in rats: behavioral and biochemical evidences. *Eur J Pharmacol* **576**, 34-42.
- Kuhad, A., and Chopra, K. (2008). Effect of sesamol on diabetes-associated cognitive decline in rats. *Exp Brain Res* **185**, 411-420.
- Kuhad, A., Sethi, R., and Chopra, K. (2008). Lycopene attenuates diabetes-associated cognitive decline in rats. *Life Sci* **83**, 128-134.
- Kuhn, H. G., Dickinson-Anson, H., and Gage, F. H. (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* **16**, 2027-2033.
- Kumagai, A. K. (1999). Glucose transport in brain and retina: implications in the management and complications of diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* **15**, 261-273.
- Kumar, A., Haroon, E., Darwin, C., Pham, D., Ajilore, O., Rodriguez, G., and Mintz, J. (2008). Gray matter prefrontal changes in type 2 diabetes detected using MRI. *J Magn Reson Imaging* **27**, 14-19.
- Kumar, A., Negi, G., and Sharma, S. S. (2012). Suppression of NF-kappaB and NF-kappaB regulated oxidative stress and neuroinflammation by BAY 11-7082 (IkappaB phosphorylation inhibitor) in experimental diabetic neuropathy. *Biochimie* **94**, 1158-1165.
- Lamprecht, R., and Dudai, Y. (1996). Transient expression of c-Fos in rat amygdala during training is required for encoding conditioned taste aversion memory. *Learn Mem* **3**, 31-41.
- Lamprecht, R., Hazvi, S., and Dudai, Y. (1997). cAMP response element-binding protein in the amygdala is required for long- but not short-term conditioned taste aversion memory. *J Neurosci* **17**, 8443-8450.

- Lan, Q., Mercurius, K. O., and Davies, P. F. (1994). Stimulation of transcription factors NF kappa B and AP1 in endothelial cells subjected to shear stress. *Biochem Biophys Res Commun* **201**, 950-956.
- Last, D., Alsop, D. C., Abduljalil, A. M., Marquis, R. P., de Bazelaire, C., Hu, K., Cavallerano, J., and Novak, V. (2007). Global and regional effects of type 2 diabetes on brain tissue volumes and cerebral vasoreactivity. *Diabetes Care* **30**, 1193-1199.
- Launer, L. J., Miller, M. E., Williamson, J. D., Lazar, R. M., Gerstein, H. C., Murray, A. M., Sullivan, M., Horowitz, K. R., Ding, J., Marcovina, S., Lovato, L. C., Lovato, J., Margolis, K. L., O'Connor, P., Lipkin, E. W., Hirsch, J., Coker, L., Maldjian, J., Sunshine, J. L., Truwit, C., Davatzikos, C., and Bryan, R. N. (2011). Effects of intensive glucose lowering on brain structure and function in people with type 2 diabetes (ACCORD MIND): a randomised open-label substudy. *Lancet Neurol* **10**, 969-977.
- Lee-Kwon, W., Park, D., Baskar, P. V., Kole, S., and Bernier, M. (1998). Antiapoptotic signaling by the insulin receptor in Chinese hamster ovary cells. *Biochemistry* **37**, 15747-15757.
- Lee, J. M., and Johnson, J. A. (2004). An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. *J Biochem Mol Biol* **37**, 139-143.
- Lee, K. W., and Cohen, P. (2002). Nuclear effects: unexpected intracellular actions of insulin-like growth factor binding protein-3. *J Endocrinol* **175**, 33-40.
- Leuner, B., Gould, E., and Shors, T. J. (2006). Is there a link between adult neurogenesis and learning? *Hippocampus* **16**, 216-224.
- Li, Z. G., Qiang, X., Sima, A. A., and Grunberger, G. (2001). C-peptide attenuates protein tyrosine phosphatase activity and enhances glycogen synthesis in L6 myoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* **280**, 615-619.
- Li, Z. G., Zhang, W., Grunberger, G., and Sima, A. A. (2002a). Hippocampal neuronal apoptosis in type 1 diabetes. *Brain Res* **946**, 221-231.
- Li, Z. G., Zhang, W., and Sima, A. A. (2002b). C-peptide prevents hippocampal apoptosis in type 1 diabetes. *Int J Exp Diabetes Res* **3**, 241-245.
- Li, Z. G., Zhang, W., and Sima, A. A. (2005). The role of impaired insulin/IGF action in primary diabetic encephalopathy. *Brain Res* **1037**, 12-24.
- Li, Z. G., Zhang, W., and Sima, A. A. (2007). Alzheimer-like changes in rat models of spontaneous diabetes. *Diabetes* **56**, 1817-1824.
- Liu, G. H., Qu, J., and Shen, X. (2008). NF-kappaB/p65 antagonizes Nrf2-ARE pathway by depriving CBP from Nrf2 and facilitating recruitment of HDAC3 to MafK. *Biochim Biophys Acta* **1783**, 713-727.
- Liu, Q., Yang, Z., Li, J., Wang, S., Wang, X., and Hao, S. (2012a). Bi-directional interaction of NF-kB in nervous system damage, learning and memory. *Neurol Psychiat Br* **18**, 186-190.
- Liu, Y. W., Zhu, X., Li, W., Lu, Q., Wang, J. Y., Wei, Y. Q., and Yin, X. X. (2012b). Ginsenoside Re attenuates diabetes-associated cognitive deficits in rats. *Pharmacol Biochem Behav* **101**, 93-98.
- Lopez de Armentia, M., Jancic, D., Olivares, R., Alarcon, J. M., Kandel, E. R., and Barco, A. (2007). cAMP response element-binding protein-mediated gene expression increases the intrinsic excitability of CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* **27**, 13909-13918.
- Lorente de No´ R. (1933). Studies on the structure of the cerebral cortex. I. The area entorhinalis. *J Psychol Neurol* **45**:381-438.

- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-275.
- Lujan, R. (2007). Subcellular regulation of metabotropic GABA receptors in the developing cerebellum. *Cerebellum* **6**, 123-129.
- Luppi, P., Cifarelli, V., Tse, H., Piganelli, J., and Trucco, M. (2008). Human C-peptide antagonises high glucose-induced endothelial dysfunction through the nuclear factor-kappaB pathway. *Diabetologia* **51**, 1534-1543.
- Lledo, P. M., Alonso, M., and Grubb, M. S. (2006). Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci* **7**, 179-193.
- Ma, L. Y., Zhang, D. M., Tang, Y., Lu, Y., Zhang, Y., Gao, Y., Xia, L., Zhao, K. X., Chai, L. Y., and Xiao, Q. (2011). Ghrelin-attenuated cognitive dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Alzheimer Dis Assoc Disord* **25**, 352-363.
- Magarinos, A. M., and McEwen, B. S. (2000). Experimental diabetes in rats causes hippocampal dendritic and synaptic reorganization and increased glucocorticoid reactivity to stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11056-11061.
- Maher, P., and Hanneken, A. (2005). Flavonoids protect retinal ganglion cells from oxidative stress-induced death. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**, 4796-4803.
- Malek, S., Chen, Y., Huxford, T., and Ghosh, G. (2001). IkappaBbeta, but not IkappaBalpha, functions as a classical cytoplasmic inhibitor of NF-kappaB dimers by masking both NF-kappaB nuclear localization sequences in resting cells. *J Biol Chem* **276**, 45225-45235.
- Malenka, R. C., and Bear, M. F. (2004). LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* **44**, 5-21.
- Malenka, R. C., Kauer, J. A., Zucker, R. S., and Nicoll, R. A. (1988). Postsynaptic calcium is sufficient for potentiation of hippocampal synaptic transmission. *Science* **242**, 81-84.
- Malenka, R. C., and Nicoll, R. A. (1999). Long-term potentiation—a decade of progress? *Science* **285**, 1870-1874.
- Malinow, R., Schulman, H., and Tsien, R. W. (1989). Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. *Science* **245**, 862-866.
- Mankovsky, B. N., Metzger, B. E., Molitch, M. E., and Biller, J. (1996). Cerebrovascular disorders in patients with diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* **10**, 228-242.
- Manschot, S. M., Biessels, G. J., de Valk, H., Algra, A., Rutten, G. E., van der Grond, J., and Kappelle, L. J. (2007). Metabolic and vascular determinants of impaired cognitive performance and abnormalities on brain magnetic resonance imaging in patients with type 2 diabetes. *Diabetologia* **50**, 2388-2397.
- Mark, R. J., Lovell, M. A., Markesbery, W. R., Uchida, K., and Mattson, M. P. (1997). A role for 4-hydroxynonenal, an aldehydic product of lipid peroxidation, in disruption of ion homeostasis and neuronal death induced by amyloid beta-peptide. *J Neurochem* **68**, 255-264.
- Markakis, E. A., and Gage, F. H. (1999). Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles. *J Comp Neurol* **406**, 449-460.
- Marre, M., and Penfornis, A. (2011). GLP-1 receptor agonists today. *Diabetes Res Clin Pract* **93**, 317-327.
- Martin, K. C., Michael, D., Rose, J. C., Barad, M., Casadio, A., Zhu, H., and Kandel, E. R. (1997). MAP kinase translocates into the nucleus of the presynaptic cell and is required for long-term facilitation in *Aplysia*. *Neuron* **18**, 899-912.

- Mastrocola, R., Restivo, F., Vercellinato, I., Danni, O., Brignardello, E., Aragno, M., and Boccuzzi, G. (2005). Oxidative and nitrosative stress in brain mitochondria of diabetic rats. *J Endocrinol* **187**, 37-44.
- Mattson, M. P., and Meffert, M. K. (2006). Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease. *Cell Death Differ* **13**, 852-860.
- Mayr, B., and Montminy, M. (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 599-609.
- McCord, J. M., and Roy, R. S. (1982). The pathophysiology of superoxide: roles in inflammation and ischemia. *Can J Physiol Pharmacol* **60**, 1346-1352.
- McCrimmon, R. J., Ryan, C. M., and Frier, B. M. (2012). Diabetes and cognitive dysfunction. *Lancet* **379**, 2291-2299.
- McCrimmon, R. J., and Sherwin, R. S. (2010). Hypoglycemia in type 1 diabetes. *Diabetes* **59**, 2333-2339.
- McNay, E. C., and Recknagel, A. K. (2011). Brain insulin signaling: a key component of cognitive processes and a potential basis for cognitive impairment in type 2 diabetes. *Neurobiol Learn Mem* **96**, 432-442.
- Meffert, M. K., Chang, J. M., Wiltgen, B. J., Fanselow, M. S., and Baltimore, D. (2003). NF-kappa B functions in synaptic signaling and behavior. *Nat Neurosci* **6**, 1072-1078.
- Meister, A., and Anderson, M. E. (1983). Glutathione. *Annu Rev Biochem* **52**, 711-760.
- Memet, S. (2006). NF-kappaB functions in the nervous system: from development to disease. *Biochem Pharmacol* **72**, 1180-1195.
- Middleton, G., Hamanoue, M., Enokido, Y., Wyatt, S., Pennica, D., Jaffray, E., Hay, R. T., and Davies, A. M. (2000). Cytokine-induced nuclear factor kappa B activation promotes the survival of developing neurons. *J Cell Biol* **148**, 325-332.
- Mijnhout, G. S., Scheltens, P., Diamant, M., Biessels, G. J., Wessels, A. M., Simsek, S., Snoek, F. J., and Heine, R. J. (2006). Diabetic encephalopathy: a concept in need of a definition. *Diabetologia* **49**, 1447-1448.
- Millan, M., Levy, I., Casamitjana, R., Bergua, M., Halperin, I., Gil-Vernet, J. M., Fernandez-Cruz, L., and Figuerola, D. (1984). Early carbohydrate metabolism after pancreas transplantation. *Diabetes Care* **7**, 405-407.
- Miranda, M., Muriach, M., Almansa, I., Arnal, E., Messeguer, A., Diaz-Llospis, M., Romero, F. J., and Bosch-Morell, F. (2007). CR-6 protects glutathione peroxidase activity in experimental diabetes. *Free Radic Biol Med* **43**, 1494-1498.
- Miranda, M., Muriach, M., Johnsen, S., Bosch-Morell, F., Araiz, J., Roma, J., and Romero, F. J. (2004). Oxidative stress in a model for experimental diabetic retinopathy: treatment with antioxidants. *Arch Soc Esp Oftalmol* **79**, 289-294.
- Miranda, M., Muriach, M., Roma, J., Bosch-Morell, F., Genoves, J. M., Barcia, J., Araiz, J., Diaz-Llospis, M., and Romero, F. J. (2006). Oxidative stress in a model of experimental diabetic retinopathy: the utility of peroxynitrite scavengers. *Arch Soc Esp Oftalmol* **81**, 27-32.
- Mohamed, A. K., Bierhaus, A., Schiekhofer, S., Tritschler, H., Ziegler, R., and Nawroth, P. P. (1999). The role of oxidative stress and NF-kappaB activation in late diabetic complications. *Biofactors* **10**, 157-167.
- Mooradian, A. D., Perryman, K., Fitten, J., Kavonian, G. D., and Morley, J. E. (1988). Cortical function in elderly non-insulin dependent diabetic patients. Behavioral and electrophysiologic studies. *Arch Intern Med* **148**, 2369-2372.

- Morris, R. G., Anderson, E., Lynch, G. S., and Baudry, M. (1986). Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* **319**, 774-776.
- Morris, R. G., Garrud, P., Rawlins, J. N., and O'Keefe, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* **297**, 681-683.
- Morrison, P. D., Mackinnon, M. W., Bartrup, J. T., Skett, P. G., and Stone, T. W. (1992). Changes in adenosine sensitivity in the hippocampus of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Br J Pharmacol* **105**, 1004-1008.
- Mullen, R. J., Buck, C. R., and Smith, A. M. (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* **116**, 201-211.
- Muriach, M., Bosch-Morell, F., Alexander, G., Blomhoff, R., Barcia, J., Arnal, E., Almansa, I., Romero, F. J., and Miranda, M. (2006). Lutein effect on retina and hippocampus of diabetic mice. *Free Radic Biol Med* **41**, 979-984.
- Nam, J. S., Cho, M. H., Lee, G. T., Park, J. S., Ahn, C. W., Cha, B. S., Lim, S. K., Kim, K. R., Ha, H. J., and Lee, H. C. (2008). The activation of NF-kappaB and AP-1 in peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with diabetic nephropathy. *Diabetes Res Clin Pract* **81**, 25-32.
- Nathan, D. M., Cleary, P. A., Backlund, J. Y., Genuth, S. M., Lachin, J. M., Orchard, T. J., Raskin, P., and Zinman, B. (2005). Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N Engl J Med* **353**, 2643-2653.
- Negi, G., Kumar, A., and Sharma, S. S. (2011). Melatonin modulates neuroinflammation and oxidative stress in experimental diabetic neuropathy: effects on NF-kappaB and Nrf2 cascades. *J Pineal Res* **50**, 124-131.
- Nho, C. W., and O'Dwyer, P. J. (2004). NF-kappaB activation by the chemopreventive dithiolethione oltipraz is exerted through stimulation of MEKK3 signaling. *J Biol Chem* **279**, 26019-26027.
- Nordmann, R. (1994). Alcohol and antioxidant systems. *Alcohol Alcohol* **29**, 513-522.
- O'Reilly, M. A., Staversky, R. J., Watkins, R. H., Reed, C. K., de Mesy Jensen, K. L., Finkelstein, J. N., and Keng, P. C. (2001). The cyclin-dependent kinase inhibitor p21 protects the lung from oxidative stress. *Am J Respir Cell Mol Biol* **24**, 703-710.
- Packer, L., Rösen, P., Tritschler, H. J., King, G. L., and Azzi, A. (2000). "Antioxidants in Diabetes Management," Marcel Dekker, New York.
- Palsamy, P., and Subramanian, S. (2011). Resveratrol protects diabetic kidney by attenuating hyperglycemia-mediated oxidative stress and renal inflammatory cytokines via Nrf2-Keap1 signaling. *Biochim Biophys Acta* **1812**, 719-731.
- Paravicini, T. M., and Touyz, R. M. (2008). NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care* **31 Suppl 2**, S170-S180.
- Parisi, V., and Uccioli, L. (2001). Visual electrophysiological responses in persons with type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* **17**, 12-18.
- Passig, C., Pinto-Hamuy, T., Moreno, J. P., Rodriguez, C., Rojas, C., and Rosas, R. (1996). Persistence of the cognitive effects of early stimulation assessed with an animal model. *Rev Med Chil* **124**, 409-416.
- Patel, M. (2004). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: cause and consequence of epileptic seizures. *Free Radic Biol Med* **37**, 1951-1962.
- Pazdro, R., and Burgess, J. R. (2010). The role of vitamin E and oxidative stress in diabetes complications. *Mech Ageing Dev* **131**, 276-286.

- Pechnick, R. N., Zonis, S., Wawrowsky, K., Pourmorady, J., and Chesnokova, V. (2008). p21Cip1 restricts neuronal proliferation in the subgranular zone of the dentate gyrus of the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 1358-1363.
- Pelligrino, D. A., Miletich, D. J., and Albrecht, R. F. (1992). Diminished muscarinic receptor-mediated cerebral blood flow response in streptozotocin-treated rats. *Am J Physiol* **262**, E447-454.
- Piconi, L., Quagliario, L., and Ceriello, A. (2003). Oxidative stress in diabetes. *Clin Chem Lab Med* **41**, 1144-1149.
- Pierson, C. R., Zhang, W., Murakawa, Y., and Sima, A. A. (2002). Early gene responses of trophic factors in nerve regeneration differ in experimental type 1 and type 2 diabetic polyneuropathies. *J Neuropathol Exp Neurol* **61**, 857-871.
- Poon, R. Y., and Hunter, T. (1998). Expression of a novel form of p21Cip1/Waf1 in UV-irradiated and transformed cells. *Oncogene* **16**, 1333-1343.
- Raber, J., Rola, R., LeFevour, A., Morhardt, D., Curley, J., Mizumatsu, S., VandenBerg, S. R., and Fike, J. R. (2004). Radiation-induced cognitive impairments are associated with changes in indicators of hippocampal neurogenesis. *Radiat Res* **162**, 39-47.
- Rains, J. L., and Jain, S. K. (2011). Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radic Biol Med* **50**, 567-575.
- Rakic, P. (2002). Adult neurogenesis in mammals: an identity crisis. *J Neurosci* **22**, 614-618.
- Ramachandran, S., Croft, P., and Neary, R. H. (2003). A prospective study in primary care in patients without vascular disease comparing levels of coronary risk factors in those recommended for lipid-lowering drugs based on either absolute risk or absolute risk reduction. *Prev Cardiol* **6**, 17-21.
- Reagan, L. P. (2002). Glucose, stress, and hippocampal neuronal vulnerability. *Int Rev Neurobiol* **51**, 289-324.
- Reagan, L. P. (2005). Neuronal insulin signal transduction mechanisms in diabetes phenotypes. *Neurobiol Aging* **26 Suppl 1**, 56-59.
- Reagan, L. P., Magarinos, A. M., Yee, D. K., Swzeda, L. I., Van Bueren, A., McCall, A. L., and McEwen, B. S. (2000). Oxidative stress and HNE conjugation of GLUT3 are increased in the hippocampus of diabetic rats subjected to stress. *Brain Res* **862**, 292-300.
- Reagan, L. P., and McEwen, B. S. (2002). Diabetes, but not stress, reduces neuronal nitric oxide synthase expression in rat hippocampus: implications for hippocampal synaptic plasticity. *Neuroreport* **13**, 1801-1804.
- Reed, D. J., Babson, J. R., Beatty, P. W., Brodie, A. E., Ellis, W. W., and Potter, D. W. (1980). High-performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols and disulfides. *Anal Biochem* **106**, 55-62.
- Ribak, C. E., Seress, L., and Amaral, D. G. (1985). The development, ultrastructure and synaptic connections of the mossy cells of the dentate gyrus. *J Neurocytol* **14**, 835-857.
- Richard, M. J., Guiraud, P., Meo, J., and Favier, A. (1992). High-performance liquid chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct in biological materials (plasma and human cells) using a commercially available reagent. *J Chromatogr* **577**, 9-18.
- Romero, M. J., Bosch-Morell, F., Romero, B., Rodrigo, J. M., Serra, M. A., and Romero, F. J. (1998). Serum malondialdehyde: possible use for the clinical management of chronic hepatitis C patients. *Free Radic Biol Med* **25**, 993-997.

- Russell, J. W., and Feldman, E. L. (1999). Insulin-like growth factor-I prevents apoptosis in sympathetic neurons exposed to high glucose. *Horm Metab Res* **31**, 90-96.
- Ryan, C. M., Williams, T. M., Finegold, D. N., and Orchard, T. J. (1993). Cognitive dysfunction in adults with type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus of long duration: effects of recurrent hypoglycaemia and other chronic complications. *Diabetologia* **36**, 329-334.
- Sairanen, M., Lucas, G., Ernfors, P., Castren, M., and Castren, E. (2005). Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus. *J Neurosci* **25**, 1089-1094.
- Santiago, A. R., Cristovao, A. J., Santos, P. F., Carvalho, C. M., and Ambrosio, A. F. (2007). High glucose induces caspase-independent cell death in retinal neural cells. *Neurobiol Dis* **25**, 464-472.
- Saravia, F., Revsin, Y., Lux-Lantos, V., Beauquis, J., Homo-Delarche, F., and De Nicola, A. F. (2004). Oestradiol restores cell proliferation in dentate gyrus and subventricular zone of streptozotocin-diabetic mice. *J Neuroendocrinol* **16**, 704-710.
- Saravia, F. E., Beauquis, J., Revsin, Y., Homo-Delarche, F., de Kloet, E. R., and De Nicola, A. F. (2006). Hippocampal neuropathology of diabetes mellitus is relieved by estrogen treatment. *Cell Mol Neurobiol* **26**, 943-957.
- Satriano, J. A., Shuldiner, M., Hora, K., Xing, Y., Shan, Z., and Schlondorff, D. (1993). Oxygen radicals as second messengers for expression of the monocyte chemoattractant protein, JE/MCP-1, and the monocyte colony-stimulating factor, CSF-1, in response to tumor necrosis factor-alpha and immunoglobulin G. Evidence for involvement of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-dependent oxidase. *J Clin Invest* **92**, 1564-1571.
- Saxena, G., Singh, S. P., Pal, R., Singh, S., Pratap, R., and Nath, C. (2007). Gugulipid, an extract of Commiphora whighitii with lipid-lowering properties, has protective effects against streptozotocin-induced memory deficits in mice. *Pharmacol Biochem Behav* **86**, 797-805.
- Schmatz, R., Mazzanti, C. M., Spanevello, R., Stefanello, N., Gutierrez, J., Correa, M., da Rosa, M. M., Rubin, M. A., Chitolina Schetinger, M. R., and Morsch, V. M. (2009). Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol* **610**, 42-48.
- Schmeichel, A. M., Schmelzer, J. D., and Low, P. A. (2003). Oxidative injury and apoptosis of dorsal root ganglion neurons in chronic experimental diabetic neuropathy. *Diabetes* **52**, 165-171.
- Schmidt, A. M., Yan, S. D., Wautier, J. L., and Stern, D. (1999). Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ Res* **84**, 489-497.
- Schmidt, K. N., Amstad, P., Cerutti, P., and Baeuerle, P. A. (1995). The roles of hydrogen peroxide and superoxide as messengers in the activation of transcription factor NF-kappa B. *Chem Biol* **2**, 13-22.
- Schnedl, W. J., Ferber, S., Johnson, J. H., and Newgard, C. B. (1994). STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. *Diabetes* **43**, 1326-1333.

- Schreck, R., Albermann, K., and Baeuerle, P. A. (1992). Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radic Res Commun* **17**, 221-237.
- Schreck, R., Rieber, P., and Baeuerle, P. A. (1991). Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* **10**, 2247-2258.
- Seri, B., Garcia-Verdugo, J. M., McEwen, B. S., and Alvarez-Buylla, A. (2001). Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci* **21**, 7153-7160.
- Seri, B., Garcia-Verdugo, J. M., Collado-Morente, L., McEwen, B. S., and Alvarez-Buylla, A. (2004). Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *J Comp Neurol* **478**, 359-378.
- Shafir, E. (1997). Diabetes in animals: contribution to the understanding of diabetes by study of its etiopathology in animal models. In "Ellenberg and Rifkin's Diabetes Mellitus; Theory and Practice." (D. J. Porte and R. S. Sherwin, eds.), pp. 301-348. Appleton & Lange, Stamford.
- Sharpless, N. E., and DePinho, R. A. (2004). Telomeres, stem cells, senescence, and cancer. *J Clin Invest* **113**, 160-168.
- Shaywitz, A. J., and Greenberg, M. E. (1999). CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem* **68**, 821-861.
- Sherin, A., Peeyush, K. T., Naijil, G., Chinthu, R., and Paulose, C. S. (2010). Hypoglycemia induced behavioural deficit and decreased GABA receptor, CREB expression in the cerebellum of streptozotocin induced diabetic rats. *Brain Res Bull* **83**, 360-366.
- Sherr, C. J., and Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* **13**, 1501-1512.
- Shors, T. J., Townsend, D. A., Zhao, M., Kozorovitskiy, Y., and Gould, E. (2002). Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. *Hippocampus* **12**, 578-584.
- Sies, H., and de Groot, H. (1992). Role of reactive oxygen species in cell toxicity. *Toxicol Lett* **64-65 Spec No**, 547-51.
- Sima, A. A. (2010). Encephalopathies: the emerging diabetic complications. *Acta Diabetol* **47**, 279-293.
- Sima, A. A., Kamiya, H., and Li, Z. G. (2004). Insulin, C-peptide, hyperglycemia, and central nervous system complications in diabetes. *Eur J Pharmacol* **490**, 187-197.
- Sima, A. A., and Li, Z. G. (2005). The effect of C-peptide on cognitive dysfunction and hippocampal apoptosis in type 1 diabetic rats. *Diabetes* **54**, 1497-1505.
- Sima, A. A., and Wahren, J. (2009). The relevance of C-Peptide in diabetes and its complications. *Rev Diabet Stud (special issue)* **6**, 136-224.
- Sima, A. A., Zhang, W., Kreipke, C. W., Rafols, J. A., and Hoffman, W. H. (2009a). Inflammation in diabetic encephalopathy is prevented by C-peptide. *Rev Diabet Stud* **6**, 37-42.
- Sima, A. A., Zhang, W., Muzik, O., Kreipke, C. W., Rafols, J. A., and Hoffman, W. H. (2009b). Sequential abnormalities in type 1 diabetic encephalopathy and the effects of C-Peptide. *Rev Diabet Stud* **6**, 211-222.
- Sindhu, R. K., Ehdaie, A., Farmand, F., Dhaliwal, K. K., Nguyen, T., Zhan, C. D., Roberts, C. K., and Vaziri, N. D. (2005). Expression of catalase and glutathione peroxidase in renal insufficiency. *Biochim Biophys Acta* **1743**, 86-92.

- Somfai, G. M., Knippel, B., Ruzicska, E., Stadler, K., Toth, M., Salacz, G., Magyar, K., and Somogyi, A. (2006). Soluble semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) activity is related to oxidative stress and subchronic inflammation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Neurochem Int* **48**, 746-52.
- Song, M. Y., Kim, E. K., Moon, W. S., Park, J. W., Kim, H. J., So, H. S., Park, R., Kwon, K. B., and Park, B. H. (2009). Sulforaphane protects against cytokine- and streptozotocin-induced beta-cell damage by suppressing the NF-kappaB pathway. *Toxicol Appl Pharmacol* **235**, 57-67.
- Sozzani, S., Bosisio, D., Mantovani, A., and Ghezzi, P. (2005). Linking stress, oxidation and the chemokine system. *Eur J Immunol* **35**, 3095-8.
- Squire, L. R. (1992). Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol Rev* **99**, 195-231.
- Srinivasan, S., Stevens, M., and Wiley, J. W. (2000). Diabetic peripheral neuropathy: evidence for apoptosis and associated mitochondrial dysfunction. *Diabetes* **49**, 1932-1938.
- Stanfield, B. B., and Trice, J. E. (1988). Evidence that granule cells generated in the dentate gyrus of adult rats extend axonal projections. *Exp Brain Res* **72**, 399-406.
- Starr, V. L., and Convit, A. (2007). Diabetes, sugar-coated but harmful to the brain. *Curr Opin Pharmacol* **7**, 638-642.
- Stewart, R., and Liolitsa, D. (1999). Type 2 diabetes mellitus, cognitive impairment and dementia. *Diabet Med* **16**, 93-112.
- Stranahan, A. M., Arumugam, T. V., Cutler, R. G., Lee, K., Egan, J. M., and Mattson, M. P. (2008). Diabetes impairs hippocampal function through glucocorticoid-mediated effects on new and mature neurons. *Nat Neurosci* **11**, 309-317.
- Surh, Y. J. (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer* **3**, 768-780.
- Suzuki, A., Tsutomi, Y., Akahane, K., Araki, T., and Miura, M. (1998). Resistance to Fas-mediated apoptosis: activation of caspase 3 is regulated by cell cycle regulator p21WAF1 and IAP gene family ILP. *Oncogene* **17**, 931-939.
- Svensk, A. M., Soini, Y., Paakko, P., Hiravikoski, P., and Kinnula, V. L. (2004). Differential expression of superoxide dismutases in lung cancer. *Am J Clin Pathol* **122**, 395-404.
- Tanaka, N., Ikeda, Y., Ohta, Y., Deguchi, K., Tian, F., Shang, J., Matsuura, T., and Abe, K. (2010). Expression of Keap1-Nrf2 system and antioxidative proteins in mouse brain after transient middle cerebral artery occlusion. *Brain Res* **1370**, 246-253.
- Taupin, P. (2007). BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *Brain Res Rev* **53**, 198-214.
- Telfer, J. F., and Brock, J. H. (2004). Proinflammatory cytokines increase iron uptake into human monocytes and synovial fibroblasts from patients with rheumatoid arthritis. *Med Sci Monit* **10**, BR91-95.
- Tesfamariam, B., Brown, M. L., and Cohen, R. A. (1991). Elevated glucose impairs endothelium-dependent relaxation by activating protein kinase C. *J Clin Invest* **87**, 1643-1648.
- Thangasamy, A., Rogge, J., Krishnegowda, N. K., Freeman, J. W., and Ammanamanchi, S. (2011). Novel function of transcription factor Nrf2 as an inhibitor of RON tyrosine kinase receptor-mediated cancer cell invasion. *J Biol Chem* **286**, 32115-32122.

- The Diabetes Control and Complications Trial Research Group (1997). Hypoglycemia in the diabetes control and complications trial. *Diabetes* **46**, 271-286.
- Torchinsky, A., and Toder, V. (2007). TNF α in the pathogenesis of diabetes-induced embryopathies: functions and targets. *Rev Diabet Stud* **4**, 200-209.
- Toth, C., Schmidt, A. M., Tuor, U. I., Francis, G., Foniok, T., Brussee, V., Kaur, J., Yan, S. F., Martinez, J. A., Barber, P. A., Buchan, A., and Zochodne, D. W. (2006). Diabetes, leukoencephalopathy and rage. *Neurobiol Dis* **23**, 445-461.
- Touyz, R. M. (2004). Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension* **44**, 248-252.
- Trush, M. A., Mimnaugh, E. G., and Gram, T. E. (1982). Activation of pharmacologic agents to radical intermediates. Implications for the role of free radicals in drug action and toxicity. *Biochem Pharmacol* **31**, 3335-3346.
- Tsukuda, K., Mogi, M., Li, J. M., Iwanami, J., Min, L. J., Sakata, A., Fujita, T., Iwai, M., and Horiuchi, M. (2008). Diabetes-associated cognitive impairment is improved by a calcium channel blocker, nifedipine. *Hypertension* **51**, 528-533.
- Ulusu, N. N., Sahilli, M., Avci, A., Canbolat, O., Ozansoy, G., Ari, N., Bali, M., Stefek, M., Stolc, S., Gajdosik, A., and Karasu, C. (2003). Pentose phosphate pathway, glutathione-dependent enzymes and antioxidant defense during oxidative stress in diabetic rodent brain and peripheral organs: effects of stobadine and vitamin E. *Neurochem Res* **28**, 815-823.
- Vajda, F. J. (2002). Neuroprotection and neurodegenerative disease. *J Clin Neurosci* **9**, 4-8.
- Van Praag, H., Schinder, A. F., Christie, B. R., Toni, N., Palmer, T. D., and Gage, F. H. (2002). Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* **415**, 1030-1034.
- Vanhanen, M., Koivisto, K., Karjalainen, L., Helkala, E. L., Laakso, M., Soininen, H., and Riekkinen, P., Sr (1997). Risk for non-insulin-dependent diabetes in the normoglycaemic elderly is associated with impaired cognitive function. *Neuroreport* **8**, 1527-1530.
- Wagner, R. T., Lewis, J., Cooney, A., and Chan, L. (2010). Stem cell approaches for the treatment of type 1 diabetes mellitus. *Transl Res* **156**, 169-179.
- Wang, S. H., Guo, Y. J., Yuan, Y., Li, L., Li, F. F., Ye, K. P., and Huang, Y. (2011). PPAR γ -mediated advanced glycation end products regulate neural stem cell proliferation but not neural differentiation through the BDNF-CREB pathway. *Toxicol Lett* **206**, 339-346.
- Warburton, E. C., Glover, C. P., Massey, P. V., Wan, H., Johnson, B., Bienemann, A., Deuschle, U., Kew, J. N., Aggleton, J. P., Bashir, Z. I., Uney, J., and Brown, M. W. (2005). cAMP responsive element-binding protein phosphorylation is necessary for perirhinal long-term potentiation and recognition memory. *J Neurosci* **25**, 6296-6303.
- Watkins, J. C., and Jane, D. E. (2006). The glutamate story. *Br J Pharmacol* **147 Suppl 1**, S100-108.
- West, A. E., Griffith, E. C., and Greenberg, M. E. (2002). Regulation of transcription factors by neuronal activity. *Nat Rev Neurosci* **3**, 921-931.
- White, M. E., Leaman, D. W., Ramsay, T. G., Kampman, K. A., Ernst, C. W., and Osborne, J. M. (1993). Insulin-like growth-factor binding protein (IGFBP) serum levels and hepatic IGFBP-2 and -3 mRNA expression in diabetic and insulin-treated swine (*Sus scrofa*). *Comp Biochem Physiol B* **106**, 341-347.

- Wilcox, R., Bousser, M. G., Betteridge, D. J., Schernthaner, G., Pirags, V., Kupfer, S., and Dormandy, J. (2007). Effects of pioglitazone in patients with type 2 diabetes with or without previous stroke: results from PROactive (PROspective pioglitazone Clinical Trial In macroVascular Events 04). *Stroke* **38**, 865-873.
- Williams, S. B., Goldfine, A. B., Timimi, F. K., Ting, H. H., Roddy, M. A., Simonson, D. C., and Creager, M. A. (1998). Acute hyperglycemia attenuates endothelium-dependent vasodilation in humans in vivo. *Circulation* **97**, 1695-1701.
- Winyard, P., Morris, C., Winrow, V., Ziaidi, M., and Blake, D. (1994). Free radical pathways in the inflammatory response. In "Free radical damage and its control" (C. Rice Evans and R. Burdon, eds.), pp. 361-383. Elsevier Science, Amsterdam.
- Witgen, B. M., Lifshitz, J., Smith, M. L., Schwarzbach, E., Liang, S. L., Grady, M. S., and Cohen, A. S. (2005). Regional hippocampal alteration associated with cognitive deficit following experimental brain injury: a systems, network and cellular evaluation. *Neuroscience* **133**, 1-15.
- Wolf, G. (2000). Cell cycle regulation in diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl* **77**, S59-66.
- Wu, C., Liu, X., Wang, Y., Tian, H., Xie, Y., Li, Q., Zhang, X., and Liu, F. (2013). Insulin-like factor binding protein-3 promotes the G1 cell cycle arrest in several cancer cell lines. *Gene* **512**, 127-133.
- Xu, G., and Sima, A. A. (2001). Altered immediate early gene expression in injured diabetic nerve: implications in regeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* **60**, 972-983.
- Yang, S. N., Tang, Y. G., and Zucker, R. S. (1999). Selective induction of LTP and LTD by postsynaptic [Ca²⁺]_i elevation. *J Neurophysiol* **81**, 781-787.
- Yerneni, K. K., Bai, W., Khan, B. V., Medford, R. M., and Natarajan, R. (1999). Hyperglycemia-induced activation of nuclear transcription factor kappaB in vascular smooth muscle cells. *Diabetes* **48**, 855-864.
- You, J., Peng, W., Lin, X., Huang, Q. L., and Lin, J. Y. (2010). PLC/CAMK IV-NF-kappaB involved in the receptor for advanced glycation end products mediated signaling pathway in human endothelial cells. *Mol Cell Endocrinol* **320**, 111-117.
- Zanelli, S. A., Solenski, N. J., Rosenthal, R. E., and Fiskum, G. (2005). Mechanisms of ischemic neuroprotection by acetyl-L-carnitine. *Ann N Y Acad Sci* **1053**, 153-161.
- Zhang, B. B., and Moller, D. E. (2000). New approaches in the treatment of type 2 diabetes. *Curr Opin Chem Biol* **4**, 461-467.
- Zhang, W. J., Tan, Y. F., Yue, J. T., Vranic, M., and Wojtowitz, J. M. (2008). Impairment of hippocampal neurogenesis in streptozotocin-treated diabetic rats. *Acta Neurol Scand* **117**, 205-210.
- Zhao, W., Chen, H., Xu, H., Moore, E., Meiri, N., Quon, M. J., and Alkon, D. L. (1999). Brain insulin receptors and spatial memory. Correlated changes in gene expression, tyrosine phosphorylation, and signaling molecules in the hippocampus of water maze trained rats. *J Biol Chem* **274**, 34893-34902.
- Zheng, H., Whitman, S. A., Wu, W., Wondrak, G. T., Wong, P. K., Fang, D., and Zhang, D. D. (2011). Therapeutic potential of Nrf2 activators in streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Diabetes* **60**, 3055-3066.
- Zimmerman, M. C., Lazartigues, E., Lang, J. A., Sinnayah, P., Ahmad, I. M., Spitz, D. R., and Davissou, R. L. (2002). Superoxide mediates the actions of angiotensin II in the central nervous system. *Circ Res* **91**, 1038-1045.



ANEXO

