

**“Implicación del estrés oxidativo y la
autofagia en un modelo experimental de
encefalopatía diabética”**

TESIS DOCTORAL

Presentada por: Esther Carrascosa Martínez

Dirigida por: Dra. Dña. M^a Inmaculada Almansa Frías

VALENCIA

2017



CEU
*Universidad
Cardenal Herrera*

Departamento de Ciencias Biomedicas

Facultad de Ciencias de la Salud

La memoria del trabajo de investigación para la obtención del grado de Doctor realizada por Dña. Esther Carrascosa Martínez, titulada: “Implicación del estrés oxidativo y la autofagia en un modelo experimental de encefalopatía diabetica”, ha sido realizada bajo la dirección de Dña. M^a Inmaculada Almansa Frias, Profesora Adjunta del Departamento de Ciencias Biomedicas de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad CEU Cardenal Herrera, y reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

Lo que suscribe en Moncada, a 14 de Febrero de 2017

Dña. M^a Inmaculada Almansa Frias

Este trabajo ha estado parcialmente financiado por:

Proyecto Emergente Generalitat Valenciana (GV/2014/127)

Proyecto de Universidad Cardenal Herrera CEU-Santander PRUCH1216.

Proyecto Fundación Mutua Madrileña 2013-2015.

AGRADECIMIENTOS

Parecía imposible, pero por fin escribo las últimas palabras de esta tesis, los agradecimientos.

En primer lugar, dar las gracias a todas/os mis compañeras/os del CEU. A Inma, si hubiera tenido que elegir una directora mejor no sería ni la mitad de buena de lo que has sido tú, gracias, gracias y mil gracias por ayudarme, entenderme y apoyarme en todo. Las dos sabemos los momentos duros de esta tesis y el agobio de este año pasado y tú siempre me has animado cuando la verdad no daba más de mí, de verdad eres de 10. A María Miranda por todo lo que ha hecho por mí estos años, por hacerme sentir como en mi casa día a día, por darme siempre todo el tiempo que necesitaba y hacerme sentir cuidada, que hoy en día eso es difícil, eres una gran persona. Sole y Laura, dos grandes amigas que siempre habéis estado ahí para resolverme todas las dudas que iban surgiendo, gracias por enseñarme a pulir mi técnica de wb y por el gran apoyo que he encontrado en vosotras en todos los aspectos, a parte de una tesis doctoral me llevo dos grandes amigas. A Rosa por estar siempre dispuesta a ayudarme y por enseñarme mis primeros pasos con el SPSS, te deseo lo mejor. A Tania, Roberto y la última incorporación Ángel, sois únicos, gracias por toda la ayuda y los buenos momentos de risas. María Sebastián la alegría y el optimismo personificado, da gusto estar cerca de alguien como tú, me has enseñado muchas cosas pero sobre todo el ayudar a los demás sin pedir nada a cambio y hoy en día hay pocas personas así, el final de esta tesis hubiera sido una locura sin ti, te debo una. A Sara, Pili, Cris, Susi, Sara, Cristina, Vane y espero no olvidar a nadie, un equipo de diez, vamos, sin palabras, mucho ánimo a las futuras doctoras.

A mi compi María Alamar, ya forma parte de mi familia. Ha vivido día a día el crecer de esta tesis y ha soportado todo mi estrés, así que mil gracias.

Gracias a mis grandes amigos, Grace, Javi, Patri, Marga, Raija y Erika. Grace y Marga por entenderme mejor que nadie y por estar siempre a mi lado, sois un ejemplo de grandes doctoras y de grandes mujeres, os quiero. Mi Javivi, único en su especie y único como amigo, siempre has estado a mi lado en lo mejor y en lo peor, espero tenerte cerca el resto de mi vida. Patri gracias por toda tu ayuda y apoyo nunca tendré palabras suficientes para decirte todo lo que significas para mí, eres mi mitad. Ray ánimo que te queda nada y ya tienes tu tesis, ya verás todo llega. Y a ti Erika por estar cerca, aunque no nos veamos mucho últimamente.

A todos mis amigos del barrio Jose, Bárbara, Raúl, Reno, Patricia, Alberto y Marta. Pirineos y el Vive siempre han sido una válvula de escape.

A Juernes, Raquel, Mariate, Xavi, Alejandro, Ximo, Saray, Iñaki, Paula, Jose, Angie, Ana, Tocha, Mariam, Paco, Javuxi y Carmen, por todos esos grandes momentos.

A mi familia. A mi tía Maribel por estar siempre a mi lado y ser un ejemplo de superación. A mi tía Esperanza, gracias por estar siempre cerca y ser mas que una tía, entenderme y apoyarme en todas mis decisiones, sin tí mi vida no sería igual, eres única en todos los aspectos y no tendría espacio suficiente para escribirte lo que significas para mí, te quiero mucho. A mis primos Nacho y Pau un ejemplo de hombres de “provecho” y de luchadores, os quiero. A mis queridos hermanos Chema e Isa sois lo más. Chemita mi mitad desde el principio agradezco cada segundo que estoy contigo porque me enseñas a ser mejor persona y estar siempre cerca de los demás cuando lo necesitan, eres una gran persona .Isitaaaa menuda fenómeno, mas que mi hermana eres todo mi amiga, mis risas, mis lloros, mi cómplice, Os quiero mucho hermanos.

A mis papis Vicenta y Valeriano, tenéis grandes valores que habéis sabido inculcarnos a mis hermanos y a mi. Sois un ejemplo de lucha por y para vuestros hijos siempre ayudándonos sin juzgarnos, sin prohibirnos, dejando que nos equivocáramos o acertáramos por nosotros mismos pero siempre siempre siempre estando a nuestro lado cada segundo y en cada momento. Todo lo que soy es gracias a vosotros, os quiero con todo mi alma.

Mi Hugo y mi Daniela, os quiero pequeños.

A toda mi nueva familia, M Carmen, Lorenzo, Alma, Dani, Luna y Noa.

Y para terminar a mi marido Lorenzo. En la vida te aparecen las cosas cuando menos te lo esperas y así fuiste tú y ahora no puedo imaginarme ni un segundo sin ti. Esta tesis es tanto mía como tuya, sin tu apoyo y ayuda no hubiera sido posible, te quiero con toda mi alma.

Y por supuesto a ti, a mi tesoro que nacerá casi a la vez que esta tesis, nada me ha hecho más feliz en esta vida que llevarte dentro y espero con impaciencia tenerte en mis brazos, mi pequeña Lola.

ÍNDICE DE TABLAS	1
ÍNDICE DE FIGURAS	3
LISTA DE ABREVIATURAS	5
INTRODUCCIÓN	9
1. DIABETES MELLITUS.....	11
1.1. DEFINICIÓN	11
1.2. CLASIFICACIÓN.....	12
1.3. TRATAMIENTO.....	14
1.3.1. Insulina y Antidiabéticos orales.....	14
1.3.2. Nuevas tendencias en el tratamiento de la diabetes	15
2. ENCEFALOPATÍA DIABÉTICA.....	16
2.1. INTRODUCCIÓN	16
2.2. HIPOCAMPO	16
2.2.1. Anatomía e histología del hipocampo	16
2.2.2. Circuito Hipocampal.....	19
2.3. PATOGÉNESIS DE LA ENCEFALOPATÍA DIABÉTICA.....	19
2.3.1. Hiperglucemia	20
2.3.2. Hipoglucemia	20
2.3.3. Enfermedad vascular	21
2.3.4. Resistencia a la insulina	21
3. ESTRÉS OXIDATIVO Y RADICALES LIBRES	22
3.1. GENERACIÓN DE RADICALES LIBRES.....	24
3.2. FISIOLÓGÍA DEL ESTRÉS OXIDATIVO.....	25
3.3. PATOLOGÍA DEL ESTRÉS OXIDATIVO	25
3.4. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA	26
3.4.1. Productos derivados de la peroxidación lipídica.....	27
3.5. DEFENSAS ANTIOXIDANTES	28
3.5.1. Sistemas antioxidantes de importancia biológica	28
3.6. EL SISTEMA GLUTATIÓN.....	29
3.6.1. Síntesis de glutatión.....	29
3.6.2. Funciones del glutatión	30
3.6.3. Función antioxidante del glutatión.....	31
3.6.4. Mantenimiento del estado tiol en las proteínas	32
4. DIABETES Y ESTRÉS OXIDATIVO	33
4.1. ESTRÉS OXIDATIVO Y ENCEFALOPATÍA DIABÉTICA	35

5. AUTOFAGÍA	37
5.1. DEFINICIÓN	37
5.2. TIPOS DE AUTOFAGIA	37
5.3. REGULACIÓN Y MARCADORES	39
5.4. AUTOFAGIA Y ESTRÉS OXIDATIVO	44
5.5. DIABETES, AUTOFAGIA Y ENCEFALOPATÍA DIABETICA	45
HIPÓTESIS	49
OBJETIVOS	53
MATERIAL Y MÉTODOS	57
1. TRATAMIENTO Y MANEJO DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN ..	59
1.1. CONDICIONES DE ESTABULACIÓN	59
1.2. MANEJO DE LOS ANIMALES	59
2. DISEÑO EXPERIMENTAL	59
2.1. INDUCCIÓN DE LA DIABETES	59
3. OBTENCIÓN Y PROCESADO DE LAS MUESTRAS	61
3.1. ANÁLISIS BIOQUÍMICO	61
4.1. DETERMINACIÓN DE LA GLUCEMIA	62
4.2. DETERMINACION DE LA HEMOGLOBINA GLICOSILADA	62
4.3. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO LOWRY	63
4.4. DETERMINACIÓN DE MALONDIALDEHÍDO	64
4.5. DETERMINACION DE GLUTATIÓN	66
4.6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA GLUTATIÓN PEROXIDASA	68
4.7. ANALISÍS DE PROTEÍNAS MEDIANTE LA TÉCNICA DE WESTERN BLOT	70
4.7.1. Determinación de proteínas por el método Bradford	70
4.7.2. Técnica de Western blot	71
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	74
RESULTADOS	75
1. VARIABLES DESCRIPTIVAS: PESO, GLUCEMIA Y HEMOGLOBINA GLICOSILADA	77
1.1. VARIACIÓN DEL PESO	77
1.2. ESTUDIO DE LA GLUCEMIA SANGUÍNEA	77
1.3. ESTUDIO DE LA HEMOGLOBINA GLICOSILADA	78
2. PARAMETROS BIOQUÍMICOS INDICADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO	79

2.1. ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE MALONDIALDEHIDO EN HOMOGENADO DE HIPOCAMPO	79
2.2. ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUTATIÓN EN HOMOGENADO DE HIPOCAMPO	80
2.3. CORRELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE MDA Y GSH EN HOMOGENADO DE HIPOCAMPO	82
2.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD GLUTATIÓN PEROXIDASA	82
2.5. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE NRF2 EN HOMOGENADO DE HIPOCAMPO	84
3. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS INDICADORES DE AUTOFAGÍA	85
3.1. LC3	85
3.2. Atg5.....	86
3.3. BECLIN1	87
3.4. LAMP-2	88
DISCUSIÓN	89
1. VARIABLES DESCRIPTIVAS DEL MODELO EXPERIMENTAL.....	91
2. IMPLICACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA ENCEFALOPATÍA DIABÉTICA.....	92
3. CAMBIOS MOLECULARES EN LA ENCEFALOPATÍA DIABÉTICA: FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN.....	94
3.1. NRF2.....	94
4. AUTOFAGIA: ESTUDIO DE MARCADORES DE AUTOFAGIA EN EL HIPOCAMPO DE RATAS DIABÉTICAS.	96
4.1. LC3	96
4.2. Atg5.....	97
4.3. BECLIN1	98
4.4. LAMP-2	99
CONCLUSIONES	101
BIBLIOGRAFÍA	105

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1:** Lista de anticuerpos utilizados para la técnica de western blot. Se detalla la dilución a la que se ha usado, la especie donde se ha producido, la casa comercial y su referencia en el catálogo. 73
- Tabla 2:** Relación de peso (g), glucemia (mg/dl) y porcentaje de hemoglobina glicosilada (%HbA1c) de todos los grupos al finalizar el experimento.. 79
- Tabla 3:** Parámetros bioquímicos obtenidos a partir del homogenado de hipocampo de todos los grupos al finalizar el experimento. En la tabla se muestra la concentración de MDA (nmol/mg proteína).* $p < 0,05$ vs todos los grupos. El tamaño muestral fue como mínimo de $n = 5$ 79
- Tabla 4:** Parámetros bioquímicos obtenidos a partir del homogenado de hipocampo de todos los grupos al finalizar el experimento. En la tabla se muestra la concentración de GSH (nmol/mg proteína).* $p < 0,05$ vs C12s. El tamaño muestral fue como mínimo de $n = 5$ 80
- Tabla 5:** Parámetros bioquímicos obtenidos a partir del homogenado de hipocampo de todos los grupos al finalizar el experimento. En la tabla se muestra la actividad de GPx (nmol/mg.min). * $p < 0.05$ vs C4s. El tamaño muestral fue como mínimo de $n=5$ 83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Prevalencia de la diabetes en la población en general	11
Figura 2: Prevalencia de las enfermedades más comunes asociadas a la diabetes en la población en general.	12
Figura 3: Microfotografía de una sección cerebral del hipocampo de ratón, teñido por la doble tinción de Timm-Nissl.....	18
Figura 4: Diagrama básico del circuito hipocampal.	19
Figura 5: Principales especies reactivas de oxígeno y antioxidantes que forman parte del desequilibrio que representa el estrés oxidativo.	24
Figura 6: Etapas que tienen lugar en la peroxidación lipídica.	26
Figura 7: Reacción entre el MDA y el TBA para formar el aducto MDA-TBA ₂	28
Figura 8: Estructura del GSH o C-glutamilcisteinil glicina, donde el glutamato N-terminal y la cisteína están unidos por el grupo carboxilo del glutamato.	29
Figura 9: Síntesis de GSH.....	29
Figura 10: Función del GSH como antioxidante.....	32
Figura 11: Participación del GSH en el mantenimiento del estado tiol de las proteínas	32
Figura 12: Posibles mecanismos que conducen al estrés oxidativo.....	34
Figura 13: Diferentes tipos de autofagia: macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas.....	38
Figura 14: Macroautofagia	39
Figura 15: Sistema de conjugación de la proteína LC3 a la membrana del autofagosoma.	40
Figura 16: Autofagia y vías de activación causadas por el estrés oxidativo.....	45
Figura 17: Línea temporal del experimento	60
Figura 18: Actividad GPx.....	68
Figura 19: Evolución temporal del peso en los diferentes grupos del experimento.	77
Figura 20: Variación de los valores de glucemia en los diferentes grupos del experimento.....	78

Figura 21: Variación de los valores de HbA1c en los diferentes grupos del experimento.....	78
Figura 22: Comparación de la concentración de MDA (nmol/mg proteína) obtenida a partir del homogenado de hipocampo de todos los grupos al finalizar el experimento .	80
Figura 23: Comparación de la concentración de GSH (nmol/mg proteína) obtenida a partir del homogenado de hipocampo de todos los grupos al finalizar el experimento..	81
Figura 24: 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 de estudio.....	82
Figura 25: Comparación de la actividad GPx (nmol/mg.min) obtenida a partir del homogenado de hipocampo de todos los grupos al finalizar el experimento.	83
Figura 26: Detección de la proteína NRF2 por WB en los diferentes grupos de estudio a las 4 y 12 semanas.....	84
Figura 27: Detección de la proteína LC3 por WB en los diferentes grupos de estudio a las 4 y 12 semanas.	85
Figura 28: Detección de la proteína Atg5 por WB en los diferentes grupos de estudio a las 4 y 12 semanas.	86
Figura 29: Detección de la proteína Beclin1 por WB en los diferentes grupos de estudio a las 4 y 12 semanas.....	87
Figura 30: Detección de la proteína LAMP-2 por WB en los diferentes grupos de estudio a las 4 y 12 semanas.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADP (Adenosin diphosphate): Adenosín difosfato

AGEs (Advanced glycation end products): Productos finales de glicación no enzimática

AGE – RAGE (Receptors of advanced glycation end products): Interacción entre los AGEs y sus receptores

AMPK: Proteína quinasa activada por AMP

AR: Aldosa reductasa

AR-GLP1: Agonistas del péptido similar al glucagón tipo 1

ARIs: Inhibidores de la aldosa reductosa

ATP (Adenosin triphosphate): Adenosín trifosfato

Atg: Proteína relacionada con la autofagia

Bcl: Linfoma de célula B

BSA (Bovine serum albumin): Albúmina sérica bovina

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

CMA: Autofagia mediada por chaperonas

DACD: Diabetes associated cognitive decline

DDP4: Inhibidores de la dipeptidil peptidasa tipo 4

DM: Diabetes Mellitus

DNFB: Dinitrofluorobenceno, reactivo de Sanger o 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno

DNP (2,4-dinitrophenyl): Derivados 2,4-dinitrofenil

DTT: Ditioneitol

EDTA: Etilendiaminotetraacético

eNOS: Enzima óxido nítrico sintasa eudotelial

ERK: Quinasa regulada por señales extracelulares

fm: fibras musgosas

GCL: Glutamato cisteína ligasa o γ -glutamilcisteína sintetasa

GCLC: Glutamato cisteína ligasa catalítica

- GCLM:** Glutamato cisteína ligasa modificadora
- GD:** Giro dentado
- G6PDH:** Glucosa - 6 - fosfato deshidrogenosa
- GLUT:** Transportador de glucosa
- GPx:** Glutación peroxidada
- GR:** Glutación reductasa
- GS:** Glutación sintetasa
- GSH:** Glutación (forma reducida)
- GSSG:** Disulfuro de glutación o forma oxidada del glutación
- GSTs:** Glutación - S - transferasa
- 4-HNE:** 4-hidroxinonenal
- HbA1c:** Hemoglobina glicosilada
- HClO:** Ácido hipocloroso
- HO₂[·]:** Radical hidroperóxido
- H₂O₂:** Peróxido de hidrógeno
- HPLC (High pressure liquid chromatography):** Cromatografía líquida de alta eficacia
- Hsc70:** Proteína de choque térmico de 70 KDa
- IGF-1:** Factor de crecimiento insulínico 1
- JNK:** Quinasa de c-Jun en la región N terminal
- LAMP-2:** Isoforma 2 de la proteína de membrana asociada al lisosoma
- LC3 (Light chain 3):** Anticuerpo de cadena ligera 3
- LOO[·]:** Radical peróxido lipídico
- LOOH:** Radical hidroxiperóxido lipídico
- MDA:** Malondialdehído
- NADPH:** Nicotinamida adenine dinucleótido fosfato
- NFKB:** Factor nuclear Kappa B
- NMDA:** N-metil-D-aspartato
- NO:** Óxido nítrico

NO₂⁻ : Dióxido nítrico

NO₃⁻ : Nitratos

N₂O₃: Trióxido dinitrógeno

NPH: Neutral Protamine Hagedom

O₂⁻ : Anión superóxido

- **OH** (Hidroxy radical): Radical hidroxilo

ONOO⁻ : Peroxinitrito

PBS (Phosphate buffer saline): Tampón fosfato salino

PCA: Ácido perclórico

PI3K: Fosfatidilinositol - 3 - quinasa

PKC: Enzima proteína quinasa C

PLP: Potenciación a largo plazo

PP: Vía perforante

PUFAs (Polyunsaturated fatty acids): Ácidos grasos poliinsaturados

RCS (Reactive chlorine species): Especies reactivas del cloro

RL: Radicales libres

RNS: Especies reactivas de nitrógeno

ROS (Reactive oxygen species): Especies reactivas de oxígeno

sch: fibras colaterales de Schaeffer

SDS (Sodium dodecyl sulfate): Dodecilsulfato sódico

SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis):
Electroforesis desnaturalizante en geles de acrilamida

SOD: Superóxido dismutasa

STZ: Estreptozotocina

TBA (Thiobarbituric acid): Ácido tiobarbitúrico

Ulk: Quinasa 1 tipo Unc 51

V-ATPasa: ATPasa vacuolar

WB: Western Blot

INTRODUCCIÓN

1. DIABETES MELLITUS

1.1. DEFINICIÓN

La Diabetes Mellitus (DM) es una enfermedad metabólica crónica caracterizada principalmente por la hiperglucemia que resulta de la deficiencia en la secreción o acción de la insulina (Figura 1). La insulina es una hormona secretada por las células β de los islotes de Langerhans del páncreas, la cual permite la utilización de la glucosa por parte de los tejidos (Jiménez et al., 2001).

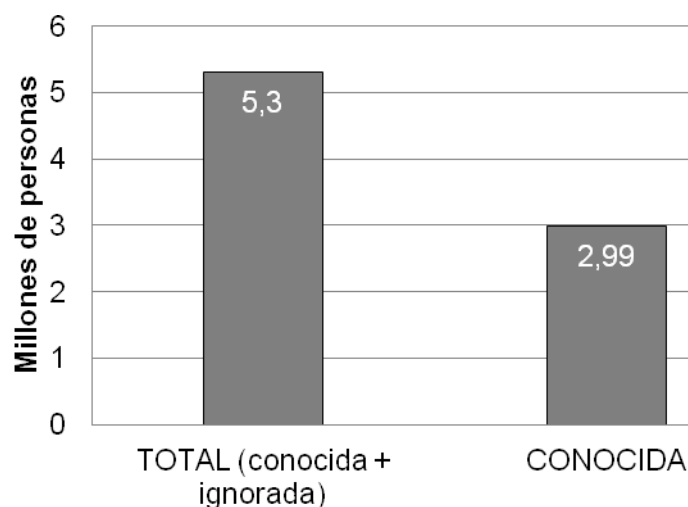


Figura 1: Prevalencia de la diabetes en la población en general (Estudio di@bet.es. Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas).

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 suelen coexistir en el mismo paciente tanto los defectos en la secreción de insulina como los defectos en su acción, resultando difícil saber cuál de las dos es la causa primaria de la hiperglucemia (American Diabetes Association, 2012).

La hiperglucemia es la causa de los síntomas que derivan de una diabetes mal controlada: poliuria, polidipsia, pérdida de peso, en ocasiones, polifagia y visión borrosa. En ocasiones 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 (Jiménez et al., 2001).

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 aterogénico (macroangiopatía) que puede afectar a las arterias coronarias, cerebrales y periféricas (Figura 2) (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 pacientes diabéticos que en no diabéticos.

A continuación, se muestran unos gráficos donde se puede observar tanto la prevalencia de la diabetes en la población en general como las complicaciones derivadas de la misma:

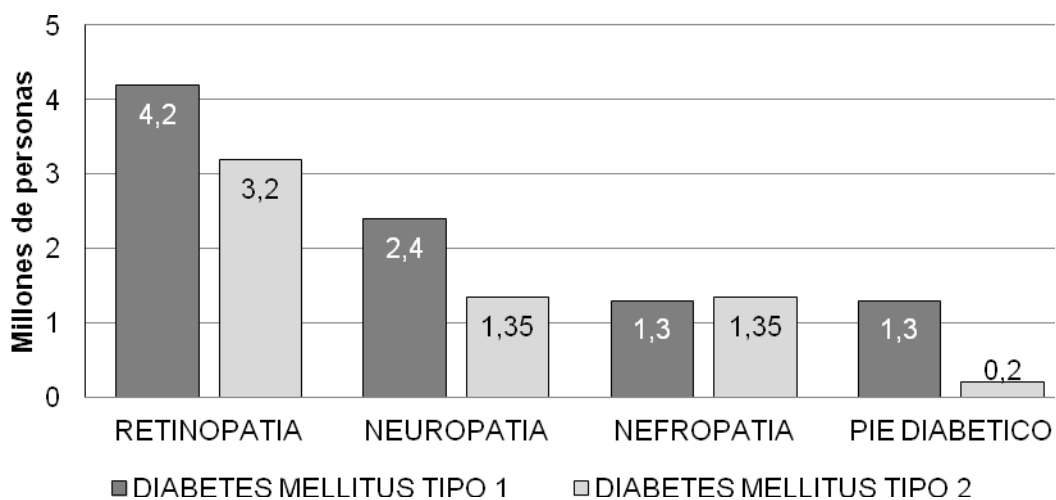


Figura 2: Prevalencia de las enfermedades más comunes asociadas a la diabetes en la población en general (Estudio di@bet.es. Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas).

1.2. CLASIFICACIÓN

Según la American Diabetes Association la diabetes se puede clasificar en los siguientes tipos: (American Diabetes Association, 2016).

- **Diabetes tipo 1 o insulino-dependiente**

Se debe a la destrucción de las células β del páncreas (autoinmune o idiopática) y que en la mayoría de los casos conduce a una deficiencia absoluta en la secreción de insulina.

- **Diabetes tipo 2 o no dependiente de insulina**

Consiste en un trastorno metabólico heterogéneo, caracterizado por una resistencia parcial a la insulina y/o una deficiencia relativa en su secreción por parte del páncreas. Los tejidos periféricos que son resistentes a la insulina, no captan correctamente la glucosa y ello conlleva la aparición de 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 que llevan a una pérdida de la regulación de los niveles de cortisol. Los pacientes con diabetes tipo 2 no presentan destrucción de células β y suele en la mayoría de los casos deberse a un exceso de peso o un acumulo de grasa en la zona abdominal.

- **Otros tipos específicos:**

- Defectos genéticos de la función de las células.
- Defectos genéticos de la acción de la insulina.
- Enfermedades del páncreas exócrino.
- Enfermedades endocrinas.
- Inducida por medicamentos o sustancias químicas.
- Infecciones.
- Formas poco comunes de diabetes mediada por alteraciones inmunológicas.
- Otros síndromes genéticos que en ocasiones se relacionan con diabetes.

- **Diabetes Mellitus gestacional**

Se trata de cualquier grado de intolerancia a la glucosa que aparece o es reconocido por primera vez durante el segundo o tercer trimestre de embarazo.

1.3. TRATAMIENTO

En la fase inicial del tratamiento de un paciente diabético es importante mejorar los síntomas atribuibles a la diabetes y evitar las consecuencias graves a corto plazo que pueden aparecer debido a un control deficiente de la glucemia. La atención continua del paciente diabético conlleva dos objetivos: mantener corregido el desequilibrio metabólico (principalmente manteniendo en valores normales los niveles de glucosa y de hemoglobina glicosilada en sangre) y prevenir las complicaciones crónicas.

Tradicionalmente el tratamiento de la DM 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 o que modifican de forma favorable el curso de la complicación.

1.3.1. Insulina y Antidiabéticos orales

La insulina es una hormona secretada por las células β de los islotes de Langerhans del páncreas y que permite la utilización de la glucosa por parte de los tejidos.

La insulina es tratamiento de elección en pacientes con DM tipo 1 en los que la producción de insulina está muy disminuida o es nula, siendo necesaria su administración para la supervivencia. También está indicada en situaciones especiales tales como pacientes diabéticos tipo 2 que no consiguen controlar su glucemia con antidiabéticos orales, en algunos casos de diabetes secundaria a otras enfermedades y con frecuencia en la diabetes gestacional (Silva et al., 2016).

La insulina, debido a su estructura proteica, es hidrolizada por los jugos gastrointestinales, lo que no permite su administración por vía oral ni a través de 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. Atrás quedaron las insulinas procedentes de animales y actualmente se emplean insulinas humanas de diferentes tiempos de acción. Las de acción rápida (Actrapid®, Regular®) o lenta tipo NPH®. También disponemos de insulinas premezcladas con una parte de rápida y otra de lenta, y en los últimos años han aparecido las insulinas análogas cada vez más adaptadas a la secreción fisiológica del páncreas. Podemos diferenciarlas claramente en dos tipos: insulinas “super rápidas” (Novo-Rapid®, Humalog®, Apidra®) y “superlentas” (Lantus® y Levemir®), que

permite mucha más flexibilidad en los horarios y el aporte de comida siempre que se domine bien el autocontrol (El Naggar and Kalra, 2016).

Con respecto a los antidiabéticos orales existe una gran diversidad 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 (toglitzazone, pioglitazone y rosglitazone) aumentan la sensibilidad del tejido a la acción de la insulina (Mata-Cases et al., 2016).

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 (Nathan, 2014). 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 (Mc Crimmon and Shermin, 2010).

1.3.2. Nuevas tendencias en el tratamiento de la diabetes

La estrategia actual para combatir la diabetes se centra en un control riguroso de la glucemia y sus complicaciones asociadas. Son pocos los pacientes diabéticos que consiguen un control riguroso de los niveles de glucosa en sangre evitando así las complicaciones a largo plazo asociadas a la diabetes. Debido a las limitaciones de la terapia hipoglucemiante, deben desarrollarse otras estrategias (Packer et al., 2000).

- **Agonistas del péptido similar al glucagón tipo 1 (AR-GLP1) e inhibidores de la dipeptidil peptidasa tipo 4 (DDP4):** se han estudiado otras dianas moleculares para el tratamiento de la diabetes como son los agonistas del receptor de glucagón y los inhibidores de la DDP4 que reducen el riesgo de hipoglucemia de los tratamientos orales tradicionales (Giorgino et al., 2013) y mejoran la sensibilidad del hígado a la insulina (Zhang and Moller, 2000).
- **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. Este procedimiento presenta varias dificultades,

como 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 sanas (Leibowitz and Levin, 1999).

- **Uso de antioxidantes para evitar las complicaciones de la diabetes:** existe una estrecha relación entre 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 (Cerelio, 2003).

2. ENCEFALOPATÍA DIABÉTICA

2.1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad poco se conoce del daño que puede provocar la diabetes a nivel cerebral. La enfermedad crónica degenerativa cerebral en la diabetes es conocida como “encefalopatía diabética”. 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). 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).

Alteraciones en el aprendizaje, la memoria, la resolución de problemas y la velocidad mental son más comunes en pacientes diabéticos tipo 1 que en la población en general (Awad et al., 2004). Se han asociado alteraciones en la regulación de la glucemia con una disminución de las funciones cognitivas, de la memoria y atrofia hipocampal en humanos (Convit et al., 2003). Varios grupos de investigación han demostrado que la hiperglucemia aumenta el daño oxidativo en el cerebro pero también se sabe que la utilización de 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 especies reactivas del oxígeno (ROS) las cuales provocan el consecuente daño neuronal (Muriach et al., 2006; Alvarez-Nolting et al., 2012).

2.2. HIPOCAMPO

2.2.1. Anatomía e histología del hipocampo

El hipocampo es una estructura del sistema nervioso central localizada en el lóbulo temporal medio, en la parte mas baja de la corteza y tocando el tronco encefálico. El

hipocampo forma parte del sistema límbico (conjunto de vías nerviosas involucradas en la génesis y creación de emociones) y participa tanto en la memoria y el aprendizaje como en la orientación espacial. También es el responsable de la neurogénesis y el control del hambre y la sed.

Anatómicamente, el hipocampo puede dividirse en dos regiones: hipocampo propio (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 and Witter, 1989).

Giro Dentado (Fascia Dentata)

Es una región cortical con forma de C que consta de tres capas (Insausti and Amaral, 2012). Las células más abundantes en esta zona 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 3):

- 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 (Po): 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 Ammon (Lorente de No 1934; Amaral 1978). Se caracteriza por su naturaleza polimórfica, compuesta por una gran variedad de tipos celulares, entre las cuales predominan las células musgosas (Amaral 1978; Ribak et al., 1985; Amaral and Witter, 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 and Das 1965; Kaplan and Bell 1984; Seri et al., 2001).

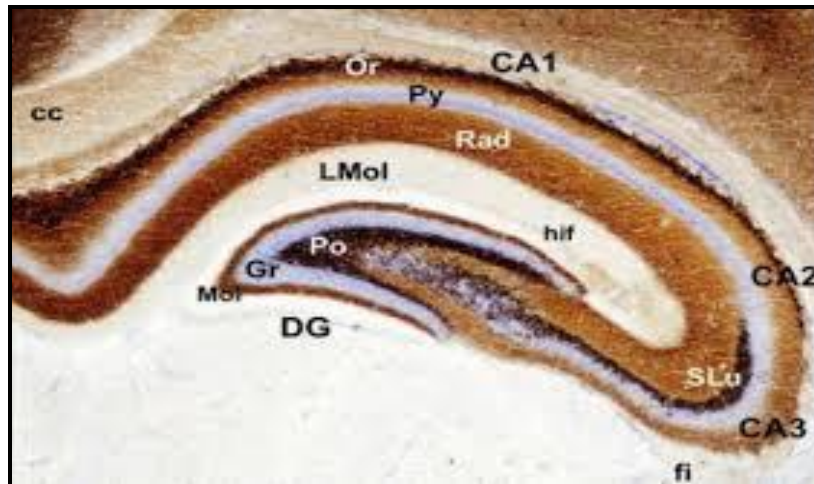


Figura 3: Microfotografía de una sección cerebral del hipocampo de ratón, teñido por la doble tinción de Timm-Nissl (<http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/840/1.INTRODUCCION>)

Hipocampo propio o Cuerno de Ammon

Está dividido en tres áreas: CA1 (la zona más distal), CA2 y CA3 (zonas más proximales) (Lorente de No´R 1934). 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 3):

- 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-molecular (LMol): situado en la parte más exterior (cercana a la fisura hipocámpica), que contiene las ramificaciones más distales de las dendritas apicales de las neuronas piramidales (Amaral and Witter, 1995).

2.2.2. Circuito Hipocampal

La información fluye a lo largo del hipocampo a través de 3 vías principales (Figura 4):

- 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.

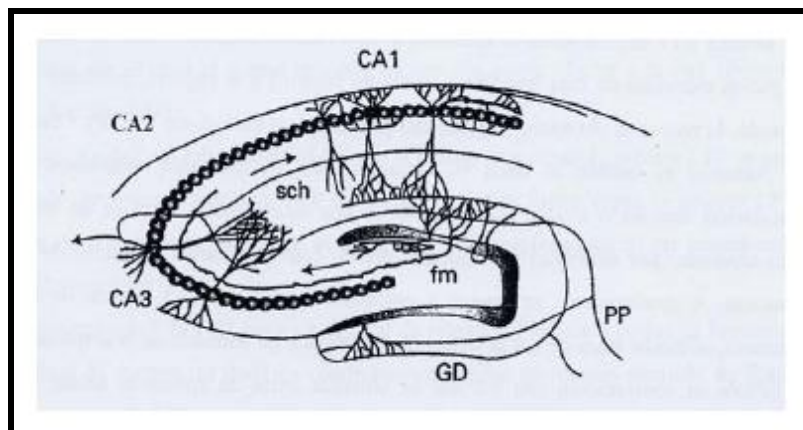


Figura 4: Diagrama básico del circuito hipocampal. PP: vía perforante; GD: giro dentado, fm: fibras musgosas, sch: fibras colaterales de Schaeffer (O'Keefe and Lynn, 1978).

2.3. PATOGÉNESIS DE LA ENCEFALOPATÍA DIABÉTICA

Existen varios factores de riesgo que pueden contribuir a la disfunción cognitiva asociada a la diabetes. Los efectos a largo plazo que provoca la diabetes a nivel cerebral se manifiestan tanto a nivel estructural como neurofisiológico y neuropsicológico. Existen múltiples factores implicados en el daño cerebral que puede provocar la diabetes, en la diabetes tipo 1 las evidencias halladas en diferentes estudios sugieren que situaciones tales como la hipoglucemia, hiperglucemia y la

presencia de complicaciones microvasculares son los principales factores causantes del desarrollo de la encefalopatía (Brands et al., 2004). 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).

2.3.1. Hiperglucemia

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

La hiperglucemia altera la función de varios órganos a través de una serie de mecanismos como: la activación de la ruta polioliol, 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 and Waxman, 2003). Como consecuencia de estos mecanismos se produce un daño oxidativo (por un aumento de ROS), un daño vascular y una respuesta inflamatoria (mediada por el factor de transcripción nuclear kappa (NFkB) (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 and 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 tanto a déficits psicológicos.

2.3.2. Hipoglucemia

La posible relación existente entre episodios repetitivos de hipoglucemia como causa de disfunción cognitiva en la diabetes es discutible y se ha visto que depende de la edad de aparición de la enfermedad.

En estudios que datan de 1993 se observan cambios en varias regiones cerebrales como la corteza 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 diversos estudios señalan que la hipoglucemia no está relacionada con 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).

2.3.3. 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 puedan ser la causa de las deficiencias funcionales vistas en los pacientes diabéticos (Mankovsky et al., 1996).

La hiperglucemia causa una disminución de la vasodilatación (Williams et al., 1998). La vasodilatación está mediada por el óxido nítrico (NO) el cual es sintetizado por la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). En situaciones de hiperglucemia se produce una reducción de la eNOS, probablemente por una disminución en la expresión de la enzima proteína quinasa C (PKC) (Teshfamariam et al., 1991) y por 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).

2.3.4. Resistencia a la 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) (Zhao et al.,

1999; Gerozissis, 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 and 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 and Biessels, 2000; Hoyer, 1998; McNay and 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 and 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 puede afectar a neurotransmisores y proteínas estructurales del citoesqueleto neuronal, dando lugar todo ello a una degeneración de las fibras nerviosas.

3. ESTRÉS OXIDATIVO Y RADICALES LIBRES

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre agentes oxidantes y antioxidantes a favor de los primeros (Figura 5) (Sies, 1997).

Se denominan radicales libres a todas aquellas moléculas que contienen en su orbital más externo un electrón desapareado, por tanto, el electrón de dicho orbital

necesitaría de otro para poseer una configuración bioquímica y electromagnética estable. Los radicales libres tienden a reaccionar ávidamente con otras moléculas cercanas para completar este orbital incompleto, desestabilizando con ello la configuración electrónica de las moléculas con las que reaccionan, convirtiéndolas a su vez en especies reactivas y pudiendo producir reacciones en cadena (Whitten and Gailey, 1985).

La terminología empleada para designar estas especies químicas presenta cierta confusión. En el organismo y en condiciones normales, la mayoría de los radicales libres (RL) proceden de la respiración aerobia y contienen oxígeno, (como el anión superóxido y el radical hidroxilo) por este motivo muchos autores los llaman ROS. Estas dos denominaciones (RL y ROS), no son exactamente sinónimos, puesto que algunas ROS no son radicales, como el peróxido de hidrógeno o el ácido hipocloroso. Otros autores hablan de oxidantes. Por todas estas razones lo habitual es referirse indistintamente a estas especies como radicales libres, ROS u oxidantes.

Existen también las especies reactivas de nitrógeno (RNS) que derivan del metabolismo del óxido nítrico. El óxido nítrico, debido al electrón desapareado que presenta en su orbital más externo es por sí mismo un radical, pero además, en su metabolismo tienen lugar reacciones con el oxígeno molecular, ROS, metales de transición o tioles que darán lugar a la producción de RNS como el peroxinitrito (ONOO^-), trióxido dinitrógeno (N_2O_3), dióxido de nitrógeno (NO_2) o nitratos (NO_3^-) y nitritos (NO_2^-), destacando entre ellas el primero por su alta reactividad. Por lo tanto, también existe el concepto de estrés nitrosativo, que se produce cuando existe una producción excesiva o desregulada del óxido nítrico y las especies reactivas del nitrógeno que de él derivan (Hausladen and Stamler, 1999). Esta situación puede ocurrir *in vivo* en distintas patologías, entre ellas las asociadas a procesos inflamatorios, neurotoxicidad, isquemias o durante la neurotransmisión que tiene lugar mediante activación de receptores NMDA (Klatt and Lamas, 2000).

Los radicales libres tal y como se describen a continuación participan tanto en procesos fisiológicos como patológicos en el organismo vivo.

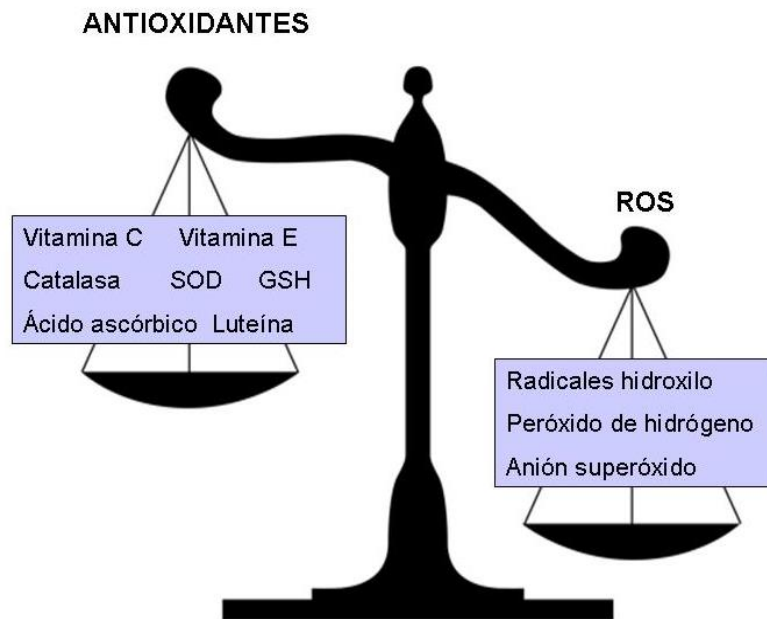


Figura 5: Principales especies reactivas de oxígeno y antioxidantes que forman parte del desequilibrio que representa el estrés oxidativo. (Elaboración propia).

3.1. GENERACIÓN DE RADICALES LIBRES

Los radicales libres más comunes son:

Especies reactivas de oxígeno (ROS): anión superóxido (O_2^-) y radical hidroxilo ($\cdot OH$).

Especies reactivas de nitrógeno (RNS): óxido nítrico ($\cdot NO$) y dióxido nítrico (NO_2^-).

Especies reactivas del cloro (RCS; reactive chlorine species): cloro atómico ($Cl\cdot$).

Estas especies reactivas son una parte esencial de la inmunidad innata que protege a las células de las infecciones, pero también contribuyen a la patogénesis de enfermedades degenerativas.

Se sabe que otras moléculas como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), peroxinitrito ($ONOO^-$) y el ácido hipocloroso ($HClO$), aunque no son radicales libres, pueden dar lugar a ellos a través de diversas reacciones químicas (Packer et al., 2000, Gilgun-Sherki et al., 2001).

Algunos de los procesos endógenos de las células que dan lugar a la formación de los RL son: la cadena de transporte electrónico en la mitocondria (Kas and Blattna, 1986), la activación de la eNOS (Beckman and Brent, 1990) o una reducida capacidad de los mecanismos antioxidantes protectores (Giugliano et al., 1996).

Sin embargo, también existen fuentes exógenas de radicales libres, como por ejemplo las radiaciones electromagnéticas o ionizantes (Fridovich, 1983) o la acción de xenobióticos y fármacos (Trush et al., 1982).

3.2. FISIOLÓGÍA DEL ESTRÉS OXIDATIVO

En cuanto al papel fisiológico, se ha demostrado la función de los radicales libres en la defensa antimicrobiana y antitumoral y su acción como mensajeros e inductores genéticos (Hardy and Hunt, 2004; Satriano et al., 1993; Zimmerman et al., 2002). Pueden intervenir en la inactivación o activación de ciertas enzimas (Fillebeen and 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 and 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).

3.3. PATOLOGÍA DEL ESTRÉS OXIDATIVO

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 and 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., 2002; Paravicini and Touyz, 2008; Svensk et al., 2004; Gupta et al., 2007; Torchinsky and 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).

3.4. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

Los ROS más prevalentes que pueden afectar mas a los lípidos son el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) y el hidroperóxido ($\text{HO}_2\cdot$). La peroxidación lipídica se describe como un proceso a través del cual oxidantes como los radicales libres atacan a lípidos que contienen dobles enlaces carbono-carbono, especialmente los ácidos grasos poliinsaturados (Poliunsaturated fatty acids, PUFAs) (Yin et al., 2011).

En general el proceso de peroxidación lipídica tiene lugar en tres pasos: iniciación, propagación y terminación (Kanner et al., 1987, Girotti, 1998, Yin et al., 2011) (Figura 6). La iniciación consiste en la formación de un radical lipídico por la acción de pro-oxidantes como el radical $\cdot\text{OH}$. En la fase de propagación el radical lipídico reacciona rápidamente con el oxígeno para formar un radical peróxido ($\text{LOO}\cdot$) el cual toma un hidrógeno de otra molécula lipídica generando nuevos radicales $\text{LOO}\cdot$ que continúan la reacción en cadena y la hidroxil-peroxidación lipídica (LOOH). Finalmente, en la reacción de terminación, los antioxidantes como la vitamina E ceden un átomo de hidrógeno a las especies $\text{LOO}\cdot$ y forman un hidroperóxido y por tanto productos no reactivos. Una vez se inicia la peroxidación, la propagación tendrá lugar hasta que los productos de terminación sean producidos (Figura 6).

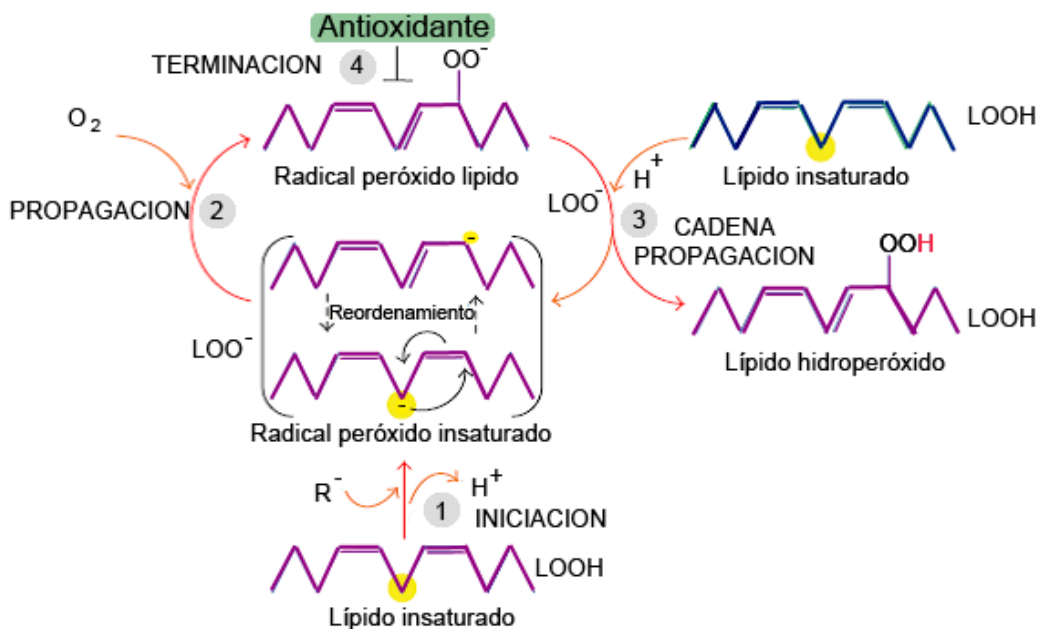


Figura 6: Etapas que tienen lugar en la peroxidación lipídica. Adaptado de Ayala (Ayala et al., 2014).

3.4.1. Productos derivados de la peroxidación lipídica.

La peroxidación lipídica produce una amplia variedad de productos de oxidación entre los que encontramos productos primarios como el radical hidroxiperóxido lipídico (LOOH) y secundarios como el malondialdehído (MDA), propanal, hexanal y 4 hidroxinonenal (4-HNE) (Benedetti et al., 1980, Esterbauer et al., 1982, Esterbauer et al., 1984, Poli et al., 1985, Esterbauer et al., 1986, Cheeseman et al., 1988, Esterbauer and Cheeseman, 1990).

El MDA es una molécula volátil, de bajo peso molecular (PM = 72,07), con un grupo 1,3-dicarbonilo siendo moderadamente ácido. En solución y en fase gaseosa, el MDA está enteramente enolizado manteniéndose a través de un enlace de hidrógeno intramolecular un equilibrio entre dos formas asimétricas. Resulta de la degradación oxidativa de los ácidos grasos poliinsaturados, especialmente del ácido araquidónico (Esterbauer et al., 1991). Se cree que el MDA se origina bajo condiciones de estrés celular y tiene una alta capacidad de reaccionar con múltiples biomoléculas como las proteínas o el ADN y de formar aductos con estas moléculas (Luczaj and Skrzydlewska, 2003, Blair, 2008, Zarkovic et al., 2013). Además, una alta producción de MDA se ha asociado a diferentes estados patológicos (Merendino et al., 2003, Baskol et al., 2006, Sanyal et al., 2009, Bartoli et al., 2011, Li et al., 2012, Garcia et al., 2013).

El MDA parece ser un producto mutagénico de la peroxidación lipídica pues contribuye de forma importante al daño y las mutaciones en el ADN (Niedernhofer et al., 2003, VanderVeen et al., 2003), mientras que el 4-HNE es el más tóxico (Esterbauer et al., 1990).

El MDA ha sido ampliamente utilizado como un marcador de peroxidación lipídica (Figura 7) y el cual se puede cuantificar por espectrofotometría de absorción visible o por fluorimetría (Pryor, 1989, Esterbauer and Cheeseman, 1990).

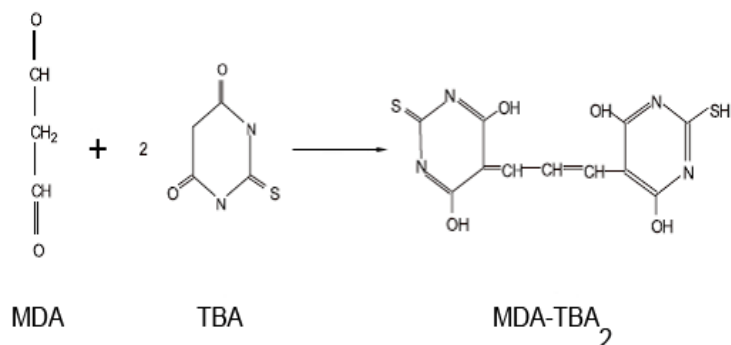


Figura 7: Reacción entre el MDA y el TBA para formar el aducto MDA-TBA₂. Adaptado de Grotto (Grotto et al., 2009).

Existe un consenso general acerca de la determinación de MDA por cromatografía líquida de alta presión (HPLC; high pressure liquid chromatography) (Chirico, 1994) empleándose dicha técnica como uno de los marcadores para determinar la implicación del MDA en una situación de estrés oxidativo patológico y evaluar el efecto del tratamiento con antioxidantes (Halliwell, 2000, Johnsen-Soriano et al., 2007).

3.5. DEFENSAS ANTIOXIDANTES

3.5.1. 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 toda macromolécula que se encuentra 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 (vitaminas C y E, GSH, etc.), por las enzimas con actividad antioxidante directa o primaria, llamadas así por inactivar directamente especies reactivas de oxígeno (catalasa, superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidada (GPx), etc.), y por las 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 (GSTs), glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), etc.) (Sies, 1997).

3.6. EL SISTEMA GLUTATIÓN

3.6.1. Síntesis de glutatión

El GSH es un tripéptido, el C-L-glutamil-L-cisteinil-glicina (Figura 8), que se encuentra en todos los tejidos de los mamíferos y cuya concentración es especialmente elevada en el hígado. El GSH existe en la forma de tiol reducido (GSH), que es la que predomina en la célula y de disulfuro oxidado (GSSG) (Kaplowitz et al., 1985).

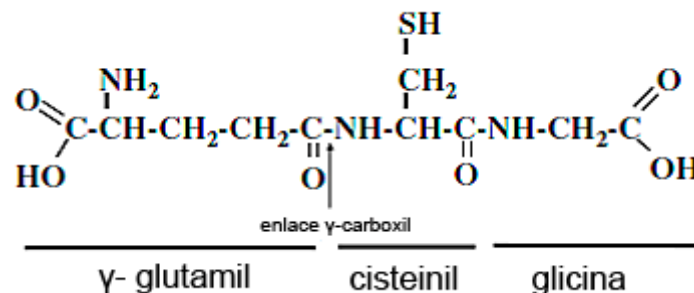


Figura 8: Estructura del GSH o C-glutamilcisteinil glicina, donde el glutamato N-terminal y la cisteína están unidos por el grupo carboxilo del glutamato. Adaptado de Lu (Lu, 2009).

Es el mayor antioxidante endógeno producido por las células y participa en la neutralización de radicales libres y compuestos reactivos del oxígeno. Es sintetizado en el citosol de todas las células (Meister and Anderson, 1983). La síntesis de GSH a partir de sus aminoácidos constituyentes implica dos pasos enzimáticos que requieren de energía en forma de adenosín trifosfato (ATP) (Figura 9):

PASO 1:



PASO 2:

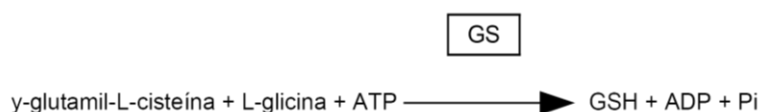


Figura 9: Síntesis de GSH (elaboración propia)

El primer paso de la biosíntesis de GSH es considerado un paso limitante y está catalizado por la enzima γ -glutamilcisteína sintetasa o la glutamato cisteína ligasa (GCL), la cual muestra un requerimiento absoluto para el Mg^{2+} o Mn^{2+} .

La GCL está compuesta por dos subunidades; una pesada o catalítica (GCLC) y una subunidad ligera o modificadora (GCLM), ambas son codificadas por diferentes genes en especies tan dispares como los humanos y la mosca de la fruta (Yan and Meister, 1990, Gipp et al., 1992, Huang et al., 1993a, Gipp et al., 1995, Dalton et al., 2004).

La GCLC es la subunidad que demuestra poseer la actividad catalítica y puede existir una inhibición de retroalimentación por el GSH (Seelig et al., 1984). La subunidad GCLM es enzimáticamente inactiva pero tiene una importante función reguladora (Huang et al., 1993a, Huang et al., 1993b), pues ratones *knockout* para la GCLM son viables pero en ausencia de la GCLM, la GCLC es catalíticamente ineficiente, dando lugar a una disminución del GSH (Yang et al., 2002).

La GCL es específica para la fracción glutamil y está regulada fisiológicamente por un ciclo de retroalimentación competitivo no alostérico de inhibición por GSH, lo cual implica unir GSH al glutamato y a otro sitio de la enzima (Richman and Meister, 1975, Huang et al., 1988); por la disponibilidad de su precursor, la L-cisteína (Meister and Anderson, 1983).

El segundo paso en la síntesis de GSH está catalizado por la glutatión sintetasa (GS). Esta enzima no se ha estudiado de forma tan amplia como la GCL. La GS purificada del hígado de rata está compuesta por dos subunidades aparentemente idénticas (Oppenheimer et al., 1979).

Debido al hecho que la γ -glutamil-L-cisteína (producto de la GCL) está presente a concentraciones excesivamente bajas cuando la GS está presente, la GCL se ha considerado como la enzima limitante para la síntesis del GSH (Dalton et al., 2004).

3.6.2. Funciones del glutatión

Las funciones principales del GSH son:

- Detoxificar electrófilos
- Neutralizar radicales libres
- Mantener el estado tiol esencial de las proteínas
- Actuar como reservorio de cisteína

- Modular procesos celulares críticos tales como la síntesis de ADN, procesos relacionados con los microtúbulos y función inmune (Meister and Anderson, 1983, Kaplowitz et al., 1985, DeLeve and Kaplowitz, 1990, Suthanthiran et al., 1990, Ganea and Harding, 2006).

Además, se ha demostrado que el GSH regula la homeostasis del óxido nítrico (Hogg, 2002), modula la actividad de las proteínas por modificaciones postraduccionales (S-glutathionilación de las proteínas) (Pompella et al., 2003) y modula la actividad de los receptores de los neurotransmisores (Oja et al., 2000). A continuación, se detallarán un poco dos de las principales funciones del GSH relacionadas con el estrés oxidativo: la función antioxidante del GSH y su papel en el mantenimiento del estado tiol de las proteínas.

3.6.3. Función antioxidante del glutati6n

Todos los organismos aer6bicos est6n sujetos a cierto nivel de estr6s oxidativo por la respiraci6n mitocondrial. Los intermediarios que se forman, tales como el H_2O_2 y el radical O_2^- pueden dar lugar a la producci6n de radicales de ox6geno t6xicos que pueden causar peroxidaci6n lip6dica y da1o celular. Para prevenir que esto suceda, el H_2O_2 producido de forma end6gena es reducido por el GSH intracelular en presencia de la GPx.

En el proceso, el GSH es oxidado a GSSG, el cual es reducido de nuevo a GSH por la GSSG reductasa (GR) con NADPH (Figura 10) formando todo ello un ciclo redox.

Esta es una de las v6as principales en muchas c6lulas para el metabolismo del H_2O_2 (Ganea and Harding, 2006, Rahman et al., 2012). Adem6s, los per6xidos org6nicos pueden ser reducidos por la GPx y tambi6n por la GSTs.

El H_2O_2 tambi6n puede ser reducido por la acci6n de la enzima catalasa, pero esta tan solo est6 presente en los peroxisomas y de aqu6 la importancia del GSH mitocondrial ya que en las mitocondrias no hay catalasa. Por ello el GSH mitocondrial es cr6tico en la defensa contra el estr6s oxidativo (Fernandez-Checa et al., 1997, Garcia-Ruiz and Fernandez-Checa, 2006). El estr6s oxidativo severo puede superar la habilidad de la c6lula para reducir el GSSG a GSH dando lugar a la acumulaci6n de GSSG. Para proteger a la c6lula de una inversi6n en el equilibrio redox, el GSSG puede ser transportado de forma activa fuera de la c6lula o reaccionar con el grupo sulfidrilo de una prote6na dando lugar a la formaci6n de un disulfuro mixto y disminuyendo el GSH celular (Lu, 1999).

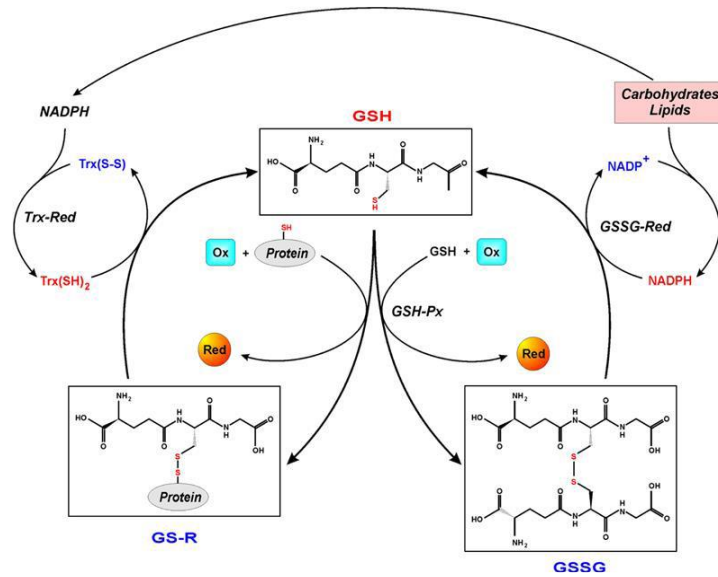


Figura 10: Función del GSH como antioxidante (Filomeni et al., 2005).

3.6.4. Mantenimiento del estado tiol en las proteínas

El GSH es la forma predominante de tiol no proteico en las células de los mamíferos, es esencial para mantener el balance redox intracelular y el estado tiol de las proteínas (Lu, 1999). En particular su fracción tiol es un potente agente reductor (Apel and Hirt, 2004).

El GSH participa en el intercambio tiol-disulfuro en una reacción catalizada por la tiol-transferasa (Figura 11).

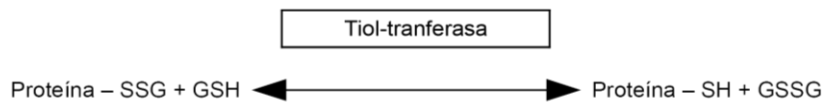


Figura 11: Participación del GSH en el mantenimiento del estado tiol de las proteínas

Esta reacción es reversible dependiendo de las concentraciones de GSH y GSSG (Lu, 1999). Normalmente, el contenido celular de GSSG es extremadamente bajo para que la formación proteína-disulfuro esté limitada. Se sabe que el equilibrio tiol-disulfuro dentro de la célula regula un número diverso de procesos metabólicos incluyendo la actividad enzimática, la actividad de transporte, la señal de transducción y la expresión génica a través de la alteración de los factores de transcripción sensibles al estado redox (Hutter et al., 1997, Lu, 1999, Townsend et al., 2003).

4. DIABETES Y ESTRÉS OXIDATIVO

En la actualidad la insulina y los antidiabéticos orales suelen ser en la mayoría de los casos el tratamiento de elección en los pacientes diabéticos, consiguiendo así un adecuado control de la glucemia en pacientes cumplidores. Debido a este hecho los estudios llevados a cabo en la actualidad se centran principalmente en minimizar las complicaciones derivadas de la misma como son la nefropatía, retinopatía, neuropatía y vasculopatía entre otras.

Se sabe que la hiperglucemia es una de las causas principales de las complicaciones asociadas a la diabetes y que un riguroso control de la glucemia está relacionado con la prevención de dichas complicaciones (Kowluru, 2003), sin embargo, poco se conoce del mecanismo a través del cual el exceso de glucosa acaba produciendo daños en los tejidos.

Aunque existen numerosos trabajos que implican al estrés oxidativo en las complicaciones de la diabetes, la posible implicación de éste en la regulación de la glucemia es un hecho todavía discutido. Es conocido que un aumento en las concentraciones plasmáticas de radicales libres pueden alterar la acción de la insulina y así contribuir a la hiperglucemia, mientras que ésta y la resistencia a la insulina, pueden por sí mismas producir estrés oxidativo (Muriach et al., 2006, Miranda et al., 2006, Ceriello, 2000).

La duda que se plantea es 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 la investigación animal se ha orientado en dilucidar esta cuestión y todo parece apuntar a que el estrés oxidativo tiene lugar antes que la aparición de las complicaciones asociadas a la diabetes y que las terapias con tratamientos antioxidantes disminuyen los niveles de agentes estresantes y las complicaciones asociadas a la enfermedad (Chucair et al., 2007, Muriach et al., 2006, Kowluru and Odenbach, 2004).

Entre las distintas vías y mecanismos que conducen al estrés oxidativo como consecuencia de la hiperglucemia se encuentran la disminución de los niveles de antioxidantes, la síntesis de prostanoides, la vía poliol, la autooxidación de la glucosa, la glicosilación proteica, las interacciones AGE-RAGE (Advanced glycation end products and advanced glycation end products receptors) y la producción de RL como el anión O_2^- (Figura 12).

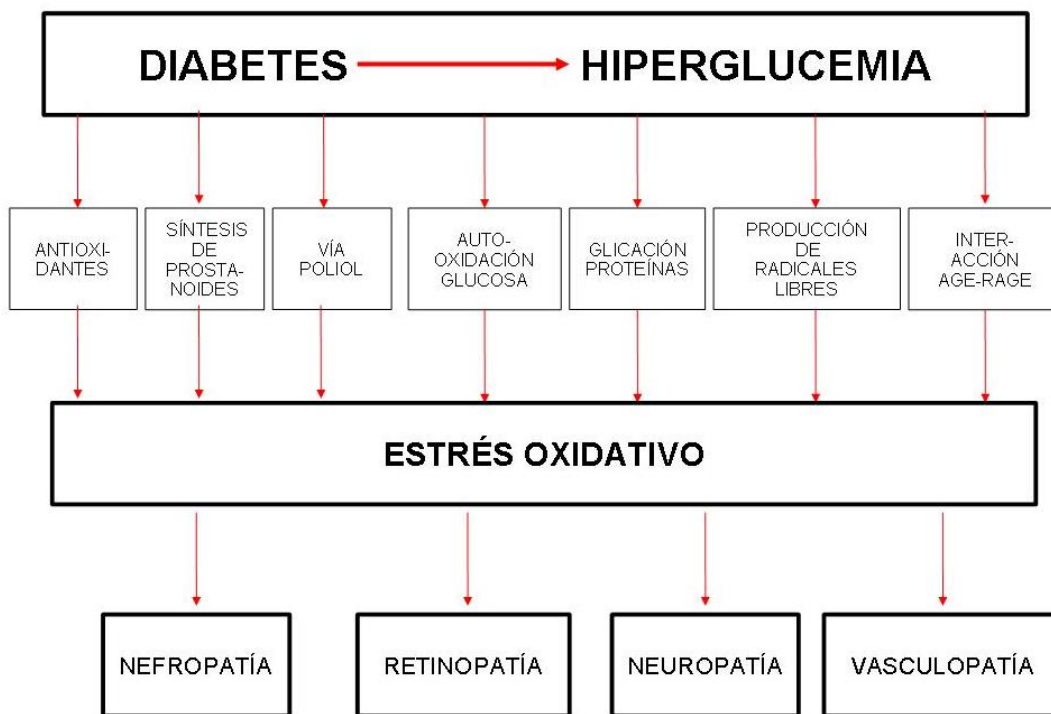


Figura 12: Posibles mecanismos que conducen al estrés oxidativo. (Adaptado de: Antioxidants in Diabetes Management. Packer, L., Rösen, P., Tritschler, H.J., King, G.L. and Azzi A., Eds., New York: Marcel Dekker, 2000).

Además, la producción aumentada del O_2^- acompañada de un incremento en la concentración de NO favorece la formación del $ONOO^-$, un fuerte oxidante y citotóxico que es capaz de iniciar la peroxidación lipídica y afectar a las diferentes vías de señalización (Ceriello, 2003).

Todos estos posibles mecanismos están relacionados unos con otros. Así, la autooxidación de la glucosa, catalizada por ciertos metales, como el hierro y el cobre, genera radicales libres (Wolf, 1993). La formación de radicales libres acelera la formación de los AGEs, que a su vez produce más radicales libres (Bas et al., 2006; Chappey et al., 1997). La unión de los AGEs a sus receptores (RAGE) está asociada a la activación y translocación nuclear del factor NF-KB (Baynes and Torpe, 1999). La reducción de la glucosa a sorbitol por la aldosa reductasa (AR) oxida NADPH, afectando directamente a la defensa antioxidante (Hohman et al., 1997). La acumulación de sorbitol produce estrés osmótico que conduce al estrés oxidativo a través de la disminución de GSH y otros antioxidantes. El tratamiento con ARIs (inhibidores de la aldosa reductasa) corrige la disminución de GSH (Baynes and

Thorpe, 1999). En algunos tejidos diabéticos, pero no en todos, la activación de la vía de la AR conduce a la activación de la proteína quinasa C (PKC) (Kim et al., 1991).

En conclusión, al respecto se puede decir que, al margen de los elevados niveles de glucosa en sangre, los pacientes diabéticos presentan una producción aumentada de radicales libres capaces de producir daño en diferentes tejidos y contribuir de esta forma a la instauración de las complicaciones tardías de la diabetes e incluso a desarrollar una resistencia a la insulina.

Actualmente está abierta una amplia gama de estudios de investigación centrados en el uso de antioxidantes para intentar evitar o minimizar las complicaciones asociadas a la diabetes. Se ha observado que, en el nervio ciático de ratas diabéticas, las defensas frente al estrés oxidativo están disminuidas (Kellogg et al., 2007; Obrosova et al., 2000). Así, se ha descrito un descenso en la actividad de la GPx en la neuropatía diabética experimental tan solo 7-21 días después de la inducción de la diabetes (Hermenegildo et al., 1993). El ácido lipóico se ha usado en el tratamiento de la neuropatía diabética tanto en modelos animales como en ensayos clínicos (Packer et al., 2001).

4.1. ESTRÉS OXIDATIVO Y ENCEFALOPATÍA DIABÉTICA

El cerebro es uno de los órganos con mayor tasa de consumo de oxígeno de nuestro organismo por lo que se ve especialmente afectado por el daño oxidativo causado por los ROS, el acumulo de lípidos y por su escasez de enzimas antioxidantes en comparación con otros tejidos.

Se han descrito numerosas patologías en las que existe afectación cerebral asociada al estrés oxidativo que tiene lugar en pacientes diabéticos, como es el caso del Alzheimer (Shibata and Kobayashi, 2008, Boyd-Kimball et al., 2005), el alcoholismo crónico (Haleng et al., 2007, Herrera et al., 2003) o los accidentes cerebrovasculares.

Existen múltiples factores implicados en el daño cerebral ocasionado por la diabetes tales como la hipoglucemia, alteraciones cerebrovasculares y en mayor grado la hiperglucemia. La hiperglucemia aumenta el daño oxidativo en el cerebro ya que reduce los niveles de antioxidantes y provoca un aumento en la producción de ROS (Muriach et al., 2006, Aragno et al., 1997). Las neuronas son células especialmente sensibles a los ROS los cuales están implicados en muchos procesos neurodegenerativos como es el caso de la diabetes (Jackson et al., 1994, Dugan et al., 1995, Yuan and Yanker 2000). En situaciones normales existe un equilibrio entre la

producción de ROS y los mecanismos antioxidantes pero diferentes estudios han demostrado que el envejecimiento de los tejidos aumenta el estrés oxidativo debido entre otras causas a la disminución en la actividad de enzimas antioxidantes (Bala et., 2006).

El estrés oxidativo también provoca la peroxidación de lípidos y proteínas acumulándose en el cerebro los productos derivados de estas reacciones (MDA Y HNE) (Bondereff 1964, Sinha et al., 2008). De igual manera también se ha visto disminuida la actividad de las enzimas que participan en la defensa antioxidante como es el caso de la SOD, catalasas y GPx (Suresh and Menon, 1993). Otras posibles causas que pueden dar lugar a una situación de estrés oxidativo en un cerebro dañado pueden deberse a la auto-oxidación de la glucosa o la baja concentración tisular de antioxidantes tales como el GSH (Reagan et al., 2000, Grillo et al., 2003, Ulusu et al., 2003, Muriach et al., 2006).

Esta alteración en los niveles de glutatión puede estar relacionada con un aumento de la actividad de la ruta de los polioles lo que conduce a un agotamiento de NADPH el cual es necesario para la reducción enzimática del GSSG.

Se ha demostrado que la diabetes está relacionada con alteraciones en la cadena de transporte de electrones mitocondrial, la formación de ROS, alteraciones en el metabolismo energético mitocondrial y estrés oxidativo siendo estos los principales responsables de las complicaciones derivadas de la misma (Moreira et al., 2009).

En este sentido Cardoso et al. ha demostrado que las mitocondrias del hipocampo de ratas diabéticas (inducida por estreptozotocina STZ) presenta un aumento de los niveles de MDA junto con una mayor actividad disulfuro de la GR y una reducción de la actividad de la SOD y de la relación GSH/GSSG. También ha demostrado una alteración de la fosforilación oxidativa caracterizada por una disminución del potencial energético mitocondrial (disminución de los niveles de ATP) y un retraso de la fase de repolarización (Cardoso et al., 2003).

5. AUTOFAGÍA

5.1. DEFINICIÓN

La homeostasis celular requiere de un equilibrio entre la síntesis (anabolismo) y la degradación (catabolismo) de macromoléculas (proteínas, lípidos, DNA, etc.). La degradación de proteínas puede llevarse a cabo a través de dos rutas principales: la proteosomal y la autofagica (Klionsky, 2007).

La autofagia es un proceso celular altamente conservado en la evolución que secuestra organelas (mitocondrias disfuncionales) y proteínas dañadas (mal plegadas) o senescentes en autofagosomas para el reciclaje de sus componentes (Levine and Kroewer, 2008) y que actúa como mecanismo de protección celular frente a una situación de estrés oxidativo prolongado. La autofagia también está involucrada en la eliminación de las células a través de la apoptosis. En este punto parece que la autofagia juega un papel protector de las células frente a agentes estresantes pero paradójicamente la autofagia puede provocar una muerte celular de tipo no apoptótico, por lo que se observa que la autofagia puede promover la protección celular o su muerte en función del entorno donde se encuentre. Defectos en los mecanismos de regulación de la autofagia se han relacionado con diferentes enfermedades como son la diabetes, el síndrome metabólico, el alcoholismo y la dislipemia (Singh et al., 2009, Donohue 2009, González et al., 2011) muy probablemente por el acúmulo de organelas y proteínas dañadas.

5.2. TIPOS DE AUTOFAGIA

Actualmente se pueden diferenciar tres tipos de autofagia en función del mecanismo a través del cual el lisosoma degrada el material intracelular. Estos tres tipos son, la macroautofagia, la microautofagia y la autofagia mediada por chaperonas (CMA) (Mizushima and Klionsky, 2007) (Figura 13).

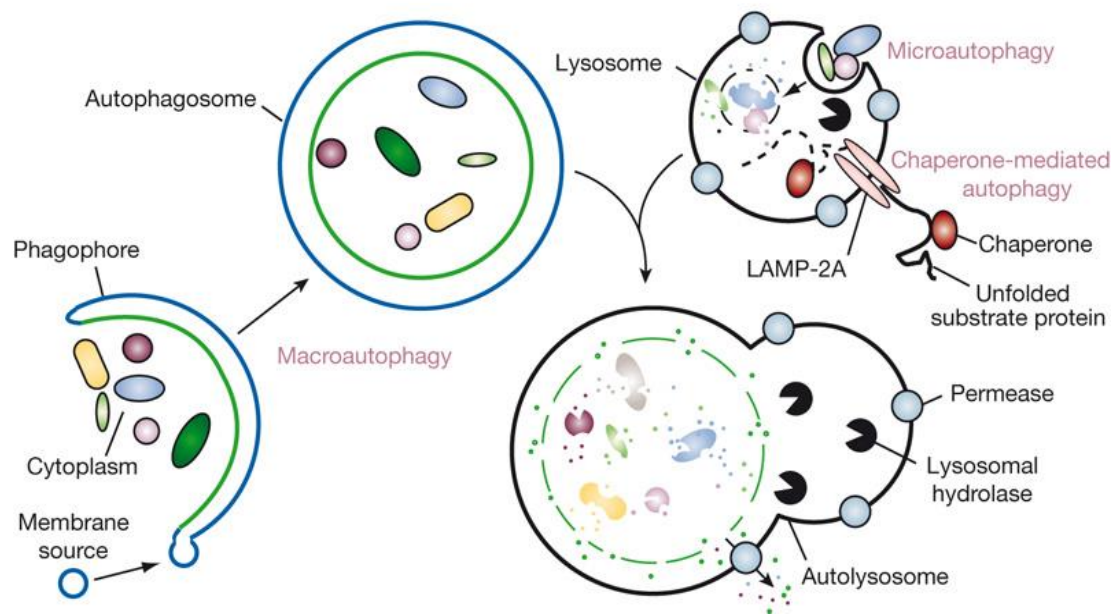


Figura 13: Diferentes tipos de autofagia: macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas (Mizushima et al., 2007).

La macroautofagia consiste en un reordenamiento dinámico de membranas y a diferencia de la degradación proteosomal, estos mecanismos implican la fusión de estructuras vacuolares con los lisosomas (Mizushima and Klionsky 2007, Yorimitsu and Klionsky 2005). La macroautofagia, supone el secuestro de proteínas, organelas y citoplasma en vesículas citosólicas de doble membrana llamadas autofagosomas, los cuales se forman a partir de una estructura pre-autofagosomal (Mizushima and Klionsky 2007, Suzuki et al., 2001). El autofagosoma es una estructura membranosa que mide entre 300 y 900 nm, una vez formado se fusiona con el lisosoma donde el contenido intravesicular es liberado hacia el lumen lisosomal, degradándose su contenido por medio de proteasas lisosomales. El resultado son moléculas que finalmente se liberan hacia el citosol para la síntesis de novo de diferentes componentes intracelulares (Mizushima and Klionsky 2007, Suzuki et al., 2001) (Figura 14). En la microautofagia también se lleva a cabo la degradación de proteínas y organelas, pero a diferencia de la “macroautofagia” es el lisosoma el que engloba directamente los diferentes blancos a degradar, además consiste en un proceso independiente a la adaptación durante la ausencia de nutrientes (Yorimitsu and Klionsky 2005, Todde et al., 2009). El tercer tipo de autofagia es la CMA. Existen múltiples proteínas con motivos KFERQ que son secuencias peptídicas que marcan proteínas citosólicas para la proteólisis lisosomal. Esta secuencia facilita la formación de un complejo con la proteína chaperona Hsc70, lo que permite dirigir el complejo

hacia su degradación al lisosoma donde la proteína lisosomal LAMP-2 (isoforma 2A de la proteína de membrana asociada a lisosoma) sirve como un adaptador y receptor, permitiendo el ingreso de la proteína blanco al lisosoma para su degradación (Massey et al., 2006, Majeski and Dice, 2004).

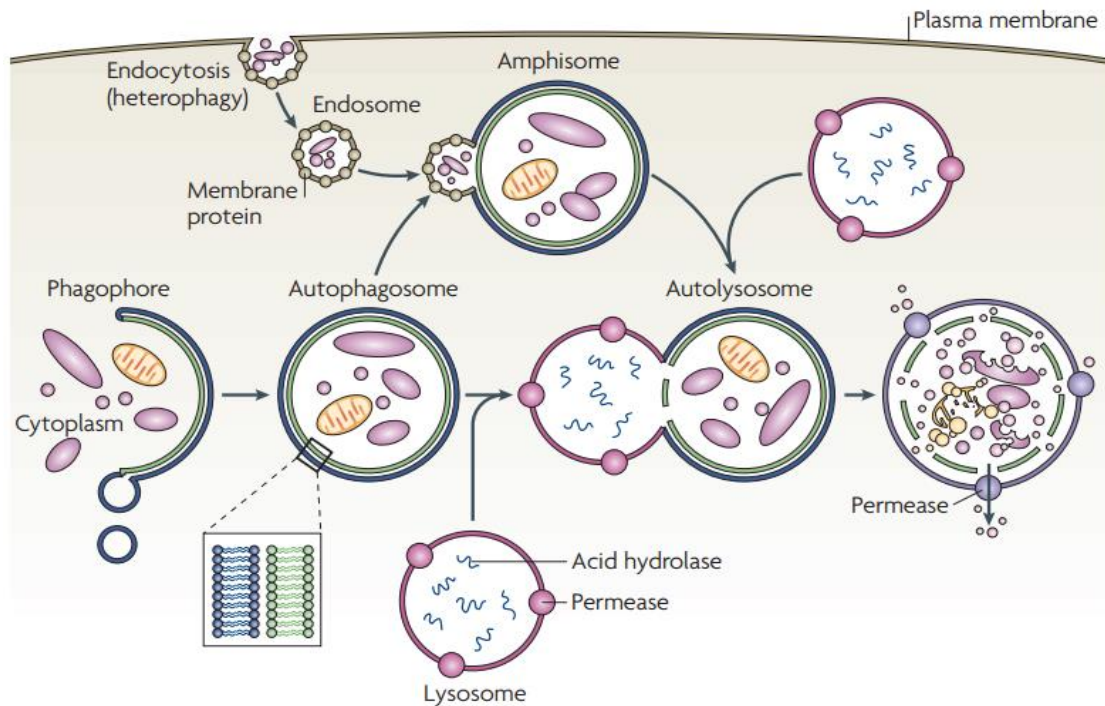


Figura 14: Macroautofagia (Klionsky, 2007).

5.3. REGULACIÓN Y MARCADORES

En las etapas del proceso autofágico como son la formación, elongación y el cierre de la doble membrana del autofagosoma intervienen unas proteínas conocidas como Atg o “genes Atg” implicados en todos estos procesos y que fueron identificados inicialmente en levaduras. En mamíferos la membrana del autofagosoma se ha propuesto que puede proceder de un subdominio del retículo endoplásmico llamado omegasoma, enriquecido con fosfatidilinositol 3-fosfato (Axe et al., 2008) y al que se añaden proteínas y lípidos de otros orígenes. En la membrana autofágica se forma el complejo Ulk (quinasa 1 tipo Unc 51) que está formado por Ulk1/2 (homólogo en mamíferos de Atg1), un homólogo en mamíferos de Atg13, FIP200 (proteína de 200 kDa que interactúa con la familia de las quinasas de adhesión focal, homólogo en mamíferos de Atg17) y Atg101. El complejo Ulk inicia la nucleación de la membrana que permite el secuestro del material citoplasmático. Además, aunque es desconocida la función exacta, se sabe que es necesario el complejo PI3K (fosfatidilinositol-3-

quinasa), ya que el complejo formado por WIPI1 (el homólogo en mamíferos de Atg18) con Atg2 y Atg9 de la membrana autofagosomal se une al fosfatidilinositol 3-fosfato generado, favoreciendo la curvatura y nucleación de la membrana. Durante la formación de la membrana autofagosomal y la nucleación participan dos sistemas de conjugación independientes que se desarrollan paralelamente hasta confluir en la lipidación de LC3 (proteína asociada a microtúbulos de cadena ligera 1A/1B 3; homólogo en mamíferos de Atg8). Estos sistemas de conjugación se llevan a cabo comúnmente por Atg7, junto con las proteínas Atg10 y Atg3. De este modo, Atg7-Atg10, por un lado y Atg7-Atg3, por otro, actúan sobre Atg12-Atg5 y LC3, respectivamente. LC3 es procesado por la cisteína proteasa Atg4 para exponer una glicina C-terminal y luego se lipida con la unión de una fosfatidiletanolamina (Taherbhoy et al., 2011). La forma LC3-fosfatidiletanolamina se conoce en mamíferos como la proteína LC3-II, el cual se emplea como marcador de niveles de autofagosomas, ya que es la única proteína específica de esas estructuras (Figura 15). Una vez formados los autofagosomas, se desplazan a lo largo de los microtúbulos (Kimura et al., 2008) donde se fusionan con endosomas y lisosomas para formar finalmente los autolisosomas. Los lisosomas poseen enzimas hidrolíticas las cuales al producirse la formación del autolisosoma se encargan de degradar el material secuestrado (Chen and Klionsky, 2011).

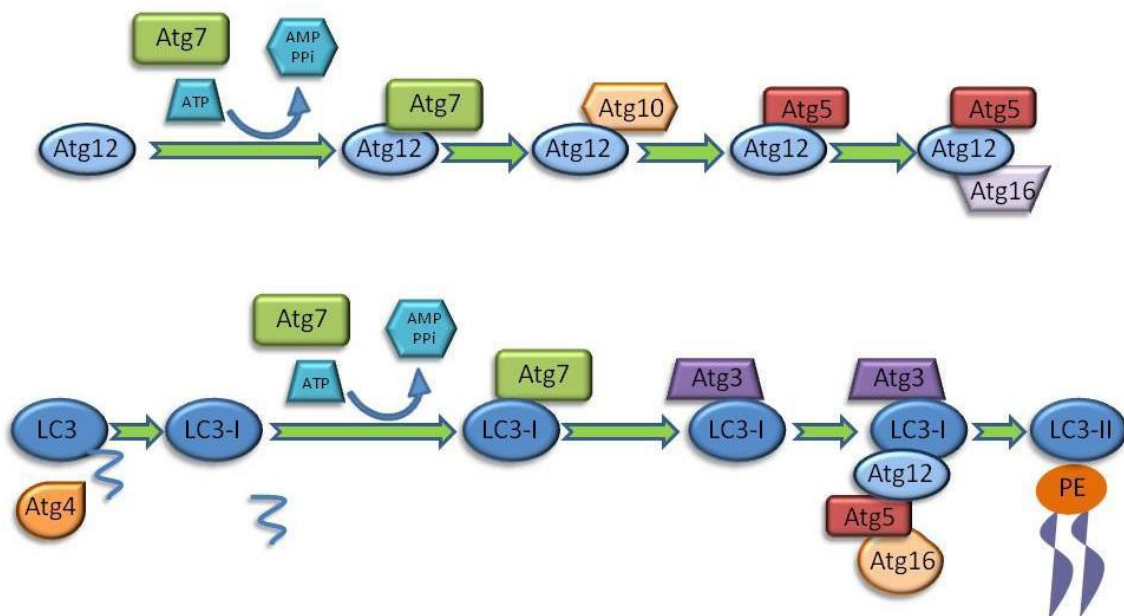


Figura 15: Sistema de conjugación de la proteína LC3 a la membrana del autofosoma.

En la formación de los autofagosomas está implicado el complejo PI3K, que está formado por las proteínas PI3K, p150, Beclin1 y Barkor, entre los que Beclin1 tiene un papel predominante. Beclin1 contiene un dominio BH3 que determina su interacción con otras proteínas y condiciona su efecto regulador sobre la autofagia. En condiciones de abundancia de nutrientes, las proteínas Bcl-2 (linfoma de célula B) y Bcl-XL se unen al dominio BH3 de Beclin1, lo que reduce su actividad pro-autofágica. En cambio, el ayuno induce su separación. Esta unión entre Beclin1 y Bcl-2 es muy importante en los diferentes procesos reguladores de la autofagia.

Regulación de la autofagia por nutrientes.

La autofagia es un proceso altamente regulado por multitud de quinasas, factores de transcripción y otras proteínas. Las condiciones ambientales de la célula son las que van a determinar en última instancia la inducción o la inhibición de la autofagia.

En los organismos pluricelulares, el crecimiento y la división celular ocurren cuando las células disponen de suficiente cantidad de energía y nutrientes, que aportan las unidades básicas necesarias para la biosíntesis de moléculas. En condiciones de escasez de nutrientes, la autofagia sirve como un mecanismo rápido de adaptación y gracias a ella, las células obtienen energía y las subunidades básicas necesarias para los diferentes procesos biosintéticos esenciales para la supervivencia celular. Por este motivo, y por lo general, la privación de nutrientes actúa como una señal de alarma que produce la activación de la autofagia.

La proteína mTORC1 es el principal complejo que controla la autofagia actuando como un sensor nutricional, activándose en presencia de factores de crecimiento y de altos niveles de aminoácidos y energía e inhibiendo la autofagia. mTORC1 es un complejo formado por la proteína quinasa mTOR, Raptor, mLST8 y PRAS40. En la regulación de ese complejo son importantes Raptor, que es una proteína que facilita la interacción de mTOR con sus sustratos, como p70S6K (quinasa de 70 kDa de la proteína ribosomal S6) y 4EBP1 (proteína 1 de unión al factor de iniciación 4E), y PRAS40, que es un regulador negativo de mTORC1 el cual si es fosforilado por el propio mTOR o por Akt se separa del complejo permitiendo la actividad de mTOR. La activación de mTORC1, por ejemplo en presencia de la hormona insulina cuyo mecanismo de inhibición de la autofagia ha sido ya bien estudiado, ocurre a través de PI3K de clase I, que activa a Akt y que a su vez inhibe a TSC1/2 (complejo de proteína de esclerosis tuberosa), de forma que la GTPasa activadora de mTORC1, Rheb puede fosforilar a este para que se inhiba la autofagia. También se ha descrito que los aminoácidos

pueden activar a mTORC1 (Sancak et al., 2010), aunque las vías de señalización a través de las que lo hacen son menos conocidas. Se piensa que en la activación de mTORC1 por diversos factores, esta quinasa es reclutada en las membranas de los lisosomas de forma dependiente del complejo GTPasa Rag. Una vez allí, Rheb fosforila a mTORC1 y esta quinasa inhibe la autofagia. Por el contrario, en ausencia de factores de crecimiento y de otros activadores de mTORC1 esto no ocurre y se induce la autofagia (Esteban et al., 2007).

Regulación de la autofagia por glucosa.

Uno de los nutrientes implicados en la regulación de la autofagia y que tiene una importancia muy relevante en este estudio es la glucosa y como nutriente que es se espera que actúe inhibiendo la autofagia. En modelos experimentales de ratón se ha observado que a nivel hepático la falta de glucosa conducirá a un incremento de la autofagia con el fin de proporcionar a la célula la energía y aminoácidos necesarios para la biosíntesis de proteínas y por el contrario el ayuno de glucosa estimula la autofagia y el metabolismo de aminoácidos glucogénicos para proporcionar más glucosa y mantener sus niveles en la sangre. En cambio, el aporte de glucosa induce la secreción de insulina e inhibe la autofagia (Ezaki et al., 2011).

Actualmente el papel de la glucosa a nivel de la regulación de la autofagia es poco conocido aunque se ha descrito la posible implicación del proceso autofágico en patologías tales como la diabetes.

En las células de los mamíferos se activa la producción y secreción de glucagón (células α del páncreas) o insulina (células β) como respuesta a niveles bajos o elevados de glucosa en sangre respectivamente. El glucagón activa la autofagia en el hígado mientras que la insulina la inhibe. Al mantener ratones en ayuno, la insulina alcanza su nivel más bajo después de 24 h, mientras que los niveles de glucagón se elevan ya desde las primeras horas del ayuno y los niveles más elevados de autofagia coinciden con esos tiempos entre 0 y 24 h (Ezaki et al., 2011). Es decir, que en situaciones de ayuno la autofagia se ve estimulada tanto por la ausencia de insulina la cual deja de ejercer su papel represor a nivel hepático y por el glucagón en su papel activador de la misma. Cuando a continuación se proporciona glucosa a los ratones en ayuno se produce el efecto contrario y se inhibe la autofagia que había sido previamente inducida por el ayuno (Ezaki et al., 2011).

Aparte de la regulación de la autofagia por la insulina y por el glucagón, la glucosa podría también modular la autofagia independientemente de estas hormonas,

principalmente debido a su papel como factor clave en el estado energético de la célula y también por la posibilidad de producir estrés oxidativo y acumulación de ROS.

Por otro lado la glucosa también promueve el ensamblaje de la V-ATPasa (bomba de H⁺ transmembrana) la cual mantiene el pH ácido en el interior del lisosoma, condición necesaria para que las hidrolasas de su interior degraden el material secuestrado, vía PI3K (Sautin et al., 2005). Como la actividad de la V-ATPasa favorece la degradación lisosomal y este es uno de los últimos pasos en el proceso autofágico, se sugiere que la glucosa tiene un papel inductor de la autofagia. Sin embargo, son pocos los trabajos que han establecido que la glucosa incrementa la autofagia, probablemente porque el concepto clásico es que la disponibilidad de nutrientes reduce la autofagia y viceversa. Estudios de Ravikumar et al. (2003) mostraron que la glucosa induce la autofagia a través de la inhibición de mTORC1. Además, se ha descrito también que la trehalosa, un disacárido compuesto por dos moléculas de glucosa, activa la autofagia, como se ha demostrado por un incremento de la degradación de agregados de ubiquitina y de α -sinucleína (Rodríguez-Navarro et al., 2010; Sarkar et al., 2007; Casarejos et al., 2011).

En contraste con estos datos, la mayoría de los investigadores consideran que en mamíferos la glucosa inhibe la autofagia (Maruyama et al., 2008; Williams et al., 2009; Hariharan et al., 2010; Kobayashi et al., 2012). Así, se ha descrito que cuando ocurre un descenso de la energía en células incubadas en un medio libre de glucosa se activa la autofagia como un mecanismo dirigido a restaurar los niveles de ATP (Singh and Cuervo, 2011). Esta caída en la energía provoca un incremento en la relación AMP/ATP, que es detectado por la enzima AMPK y que induce la autofagia (Kim et al., 2011) a través de diferentes mecanismos. Por el contrario, otros autores concluyen que la disminución de ATP no es necesaria para la inducción de la autofagia por la privación de glucosa, sino que también se puede deber al estrés del retículo endoplásmico (Xi et al., 2011). Aunque el tratamiento con 2-deoxi-D-glucosa reduce el contenido de ATP intracelular y activa a AMPK, el tratamiento con manosa reduce el estrés del retículo endoplásmico sin afectar a los niveles de ATP, recuperándose la homeostasis celular y disminuyendo los niveles de LC3-II (Xi et al., 2011). Es decir, la manosa reduce la autofagia, independientemente del ATP, disminuyendo el estrés del retículo endoplásmico.

Por otro lado, tanto la privación como una elevada concentración de glucosa pueden llevar a un incremento de ROS, con la consiguiente inducción del estrés del retículo y en consecuencia de la autofagia (Marambio et al., 2010; Younce and Kolattukudy,

2010; Wang et al., 2011). La producción de ROS ocurre normalmente como consecuencia de la fosforilación oxidativa mitocondrial. Un incremento importante de los niveles de ROS puede causar daños en el DNA y en las proteínas y más específicamente en componentes mitocondriales. Para evitar esto, la célula puede inducir la autofagia como mecanismo citoprotector (Kanki et al., 2011) a través de una vía dependiente de Beclin1. En condiciones normales, Beclin1 se encuentra inactivo formando un complejo con Bcl-2. Al aumentar los niveles de ROS, Bcl-2 se ubiquitina y se degrada a través de la vía ubiquitina-proteasomas, de forma que Beclin1 queda libre y aumenta la autofagia. Por el contrario, se ha descrito que el ayuno aumenta los niveles de H₂O₂, lo que produce la oxidación e inhibición de la proteasa Atg4 de forma que no puede lipidar LC3-II de la fosfatidiletanolamina de la membrana de los autofagosomas lo que impide que la proteína LC3 se recicle para ser de nuevo utilizada e inducir la autofagia (Essick and Sam, 2010). Es decir, aunque en general se considera que los niveles elevados de ROS inducen la autofagia, en determinadas condiciones también pueden tener un efecto negativo sobre esta.

5.4. AUTOFAGIA Y ESTRÉS OXIDATIVO

La hiperglucemia provoca una disminución de la defensa antioxidante del organismo así como un aumento en la producción de ROS lo que contribuye a provocar daños en los tejidos de pacientes con DM debido a alteraciones en el potencial redox de las células (Beckman and Ames, 1998; Bonnefout-Rousselot, 2002).

El incremento de los niveles de ROS se produce cuando aumenta el transporte electrónico en las mitocondrias y puede suceder tanto por la ausencia como por elevadas concentraciones de glucosa (Liu et al., 2003; Yu et al., 2006). Esta acumulación de ROS puede provocar la estimulación de la autofagia. Al parecer, la inducción de la autofagia por el incremento en los niveles de ROS se debe a la activación de AMPK o de las tres principales proteínas quinasa activadas por mitógeno (MAPK), JNK, ERK o p38 (Figura 16).

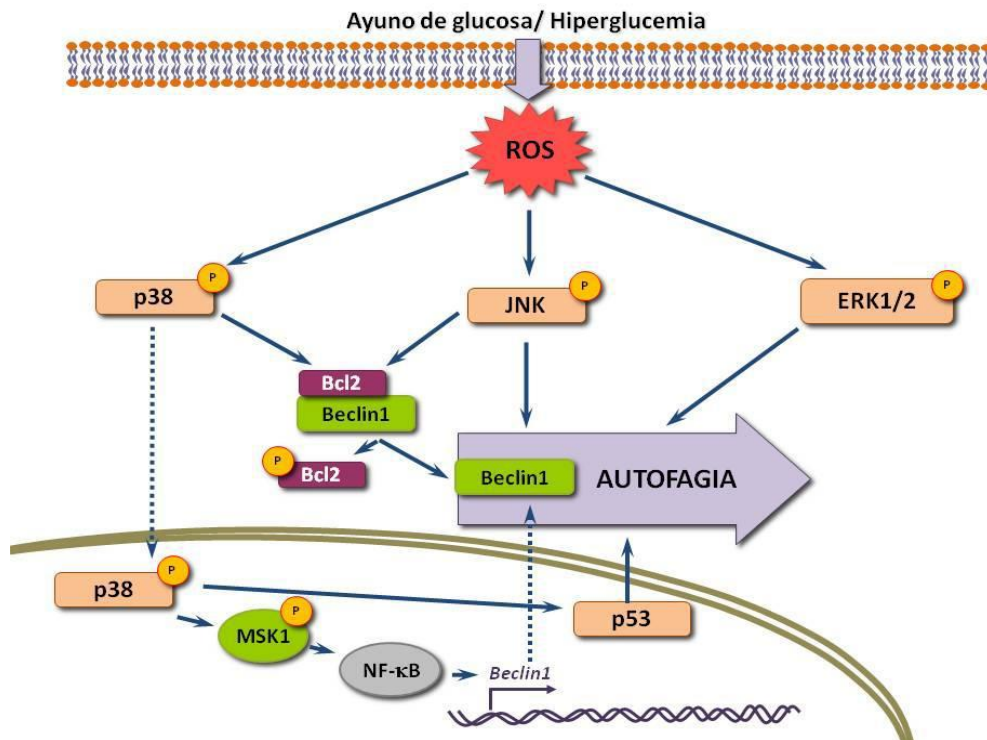


Figura 16: Autofagia y vías de activación causadas por el estrés oxidativo.

En el caso de la MAPK p38, esta puede inducir la autofagia a través de dos mecanismos. Primero, p38 fosforila Bcl-2, lo que rompe el complejo Bcl-2/Beclin1 que inhibe la autofagia. Segundo, p38 puede translocar al núcleo, donde activa a p53 y, a través de la quinasa MSK1, a NFκB, ambos activadores de la autofagia. Además, JNK también puede fosforilar a Bcl-2 e impedir la formación del complejo Bcl-2/Beclin1 que no deja iniciar la autofagia. Finalmente, ERK puede activar la autofagia a través de TSC1/2.

5.5. DIABETES, AUTOFAGIA Y ENCEFALOPATÍA DIABÉTICA.

Ya en 1922 se reconoció que la diabetes podía provocar una disfunción cognitiva (Miles and Root, 1922). Desde entonces, los estudios en modelos experimentales y en pacientes aportaron información sobre alteraciones en la neurotransmisión, cambios electrofisiológicos, anomalías estructurales y alteraciones neuroconductuales, en particular disfunción cognitiva y mayor riesgo de depresión (Biessels et al., 1994). Hoy ya se conoce que la diabetes aumenta el riesgo de padecer enfermedad de Alzheimer y cualquier otro tipo de demencia (Biessels et al., 2006; Cheng et al., 2012). El cerebro es un órgano con una elevada tasa de consumo de oxígeno por lo que se ve especialmente afectado por el daño oxidativo, el acúmulo de lípidos y por su escaso nivel de enzimas antioxidantes en comparación con otros tejidos.

La relación existente entre la afectación cerebral y la diabetes en parte se debe al estrés oxidativo mediado por los radicales libres. La situación de hiperglucemia que se produce en la diabetes conduce a una mayor producción de ROS, a la disfunción mitocondrial y al estrés del retículo endoplásmico que causa un mal plegamiento de las proteínas y la formación de agregados, por ejemplo en las células β del páncreas (Nakatani et al., 2005). En esas condiciones, un incremento de la autofagia favorece el mantenimiento de la estructura, la masa y la función de las células, ya que ayuda a degradar estos agregados que no pueden ser eliminados por los proteasomas al ser demasiado grandes. Si la autofagia se inhibe, puede observarse un incremento en la actividad de la caspasa-3, reduciéndose la supervivencia de las células (Han et al., 2010), así como un aumento del estrés oxidativo. Aunque la autofagia puede tener un papel citoprotector durante la hiperglucemia, un aumento excesivo de la autofagia puede reducir la masa mitocondrial con implicaciones negativas. El estrés del retículo endoplásmico originado por la hiperglucemia causa una activación sostenida de JNK1, implicada en el desarrollo de la obesidad y en la resistencia a la insulina, que finalmente sobreestimulan la autofagia. La inhibición de esta quinasa reduce la hiperglucemia y mejora la sensibilidad a la insulina (Kaneto et al., 2004).

Está descrito el papel que tiene la insulina en la regulación del metabolismo de la glucosa a nivel de los tejidos periféricos, pero dicha hormona también juega un papel muy importante a nivel de numerosas funciones cerebrales, como pueden ser la cognitiva, la memoria y la plasticidad sináptica a nivel de la formación del complejo insulina-receptor de insulina (IR). Por tanto cabe esperar que alteraciones en la señalización de la insulina (hipoinsulinemia en la DM tipo 1 y hiperinsulinemia en la DM tipo 2 estén relacionadas con enfermedades neurológicas (Xu et al., 2004).

Las neuronas son células no dependientes de insulina aunque su sensibilidad a dicha hormona está demostrada a través de diferentes estudios (Belfiore et al., 2009) lo que sugiere que la resistencia a la insulina también se pueda desarrollar a nivel cerebral. Los receptores de insulina se encuentran ampliamente distribuidos a través del cerebro (bulbo olfativo, corteza cerebral, hipocampo, hipotálamo y amígdala). Una resistencia a la insulina por parte de las neuronas sensoriales puede provocar una respuesta inadecuada a las señales del factor de crecimiento lo que puede contribuir al desarrollo de la neurodegeneración y la neuropatía diabética. Por otra parte la insulina regula el metabolismo mitocondrial y la capacidad oxidativa a través de la vía de señalización PI3K/Akt (Stiles, 2009; Cheng et al., 2010) por lo tanto una disminución en esta vía de señalización provocada por un estado de hiperinsulinemia puede afectar profundamente a la función mitocondrial en las neuronas y dar lugar a un

aumento del estrés oxidativo (Fisher-Wellman and Neuffer, 2012). Por lo tanto está demostrado que los productos derivados del aumento del estrés mitocondrial (ROS) están estrechamente relacionados con las patologías asociadas a la DM y con el aumento de la resistencia a la insulina a nivel cerebral.

Actualmente existe una intensa investigación sobre el papel que desempeña las alteraciones a nivel de la autofagia con las complicaciones derivadas de la diabetes y entre ellas la encefalopatía diabética. Hoffman y sus colaboradores (Hoffman et al., 2010) han descrito varios candidatos que pueden intervenir en la estimulación/inducción de la autofagia entre los que destacan la deficiencia/resistencia a la insulina (Barrett et al., 1982; Schworer et al., 1979), el déficit de factor de crecimiento tipo insulínico 1 (IGF-1) y su receptor, la hiperglucagonemia y la hiperglucemia (Liu et al., 2010). Otros candidatos que también han sido motivo de estudio como posibles candidatos de las alteraciones de la autofagia son alteraciones en la síntesis y degradación de proteínas debido al estrés oxidativo (Ding et al., 2007), alteraciones en el metabolismo de los lípidos (Singh et al., 2009; Kim et al., 2007), incremento en la producción de cetonas y aldehídos (Finn and Dice, 2005; Hill et al., 2008) y la peroxidación lipídica (Hoffman et al., 2011; Muller et al., 2011). Además también se pueden atribuir las modificaciones de las proteínas asociadas a la diabetes a defectos en la autofagia (Martínez-Vicente et al., 2005).

Hoffman et al. también documentaron que la autofagia se ve aumentada en el cerebro de pacientes jóvenes DM tipo 1 con mal control metabólico y con un incremento del estrés oxidativo (Hoffman et al., 2012). Por otra parte, en pacientes jóvenes con DM tipo 1 se ha hallado una expresión significativa de marcadores de autofagia tanto en la materia blanca como gris del cerebro lo cual está en consonancia con los déficits estructurales en dichos pacientes (Wessels et al., 2007; Aye et al., 2011) y la atrofia de la materia blanca en el lóbulo frontal y temporal en casos de cetoacidosis diabética (Hoffman et al., 2010).

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 también está asociada con déficits cognitivos moderados y cambios neurofisiológicos y estructurales en el cerebro, un estado denominado 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 la 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, siendo los factores más implicados en estas alteraciones el estrés oxidativo y la autofagia y por tanto el presente trabajo se centra en determinar la implicación de marcadores de estas situaciones en el hipocampo de ratas diabéticas.

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

El estrés oxidativo y la autofagia forman parte de las alteraciones moleculares en la encefalopatía diabética.

OBJETIVOS

Para poder demostrar la hipótesis planteada se proponen los siguientes objetivos:

- 1.** Evaluar la implicación del estrés oxidativo en las alteraciones en el hipocampo de rata en un modelo experimental de diabetes.
- 2.** Estudiar el papel que desempeña la autofagia, midiendo la expresión de las proteínas Beclin1, LC3, LAMP-2 y Atg5 en el hipocampo de rata en un modelo de diabetes.
- 3.** Describir la evolución temporal del estrés oxidativo y los marcadores de autofagia en el hipocampo de un modelo experimental de diabetes en rata.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. TRATAMIENTO Y MANEJO DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

1.1. CONDICIONES DE ESTABULACIÓN

La estabulación se realizó en las instalaciones de la unidad de investigación del departamento de Ciencias Biomédicas de la Universidad CEU-Cardenal Herrera.

Los animales permanecieron durante el experimento en jaulas con condiciones controladas de temperatura (20 °C) y humedad (60 %), bajo ciclos constantes de luz-oscuridad de 12 horas, de 8:00 a 20:00 y de 20:00 a 8:00. Durante su estabulación, los animales tuvieron libre acceso al agua y a una dieta estándar para pequeños animales de laboratorio, fabricada y distribuida por Harlan Ibérica SL (Barcelona, España).

1.2. MANEJO DE LOS ANIMALES

La manipulación y cuidado de los animales se realizó siguiendo las normativas internacionales de la Unión Europea según la legislación 86/609/ECC y teniendo la precaución de evitar cualquier estrés innecesario o infligir dolor a los mismos. Los ensayos experimentales fueron aprobados por el comité ético de la Universidad CEU-Cardenal Herrera (referencia 11/013) y el número de animales se redujo al mínimo necesario con el objetivo de garantizar la fiabilidad de los resultados obtenidos.

2. DISEÑO EXPERIMENTAL

2.1. INDUCCIÓN DE LA DIABETES

Para el presente estudio se emplearon ratas macho adultas de raza Wistar. Se estableció un periodo de una semana antes de iniciar el experimento con el objetivo de aclimatar los animales a las nuevas condiciones de estabulación.

Inicialmente se disponía de una $n = 40$ teniendo en cuenta que el objetivo era conseguir finalmente una n entre 5 y 10 para cada grupo y asumiendo las posibles pérdidas de animales durante el desarrollo del experimento. La diabetes se indujo a los animales de experimentación, con una inyección intraperitoneal de dosis única de una solución de estreptozotocina (STZ) disuelta en tampón citrato 10 mM, pH 5,5, en las ratas consideradas grupo control se les inyectó únicamente el vehículo de la STZ (tampón citrato). La dosis empleada de STZ fue de 65 mg/kg de peso. Las ratas fueron consideradas diabéticas cuando su glucemia fue superior a 12 mM (225 mg/dl) a los

tres días de la inyección de STZ. Debido a la larga duración del experimento a aquellas ratas que durante la evolución del experimento su peso fuese inferior a 200 g (uno de los síntomas característicos de la diabetes es la pérdida de peso) se les inyectó una dosis de mantenimiento de insulina (0,02 ml insulina Humulina NPH 100 UI/ml vía subcutánea) que no lograba normalizar la glucemia, consiguiendo así la supervivencia del animal, pero evitando revertir la diabetes. Tal como se muestra en la figura 15 la duración del experimento fue de 4 y 12 semanas a partir de la inducción de la diabetes. En la semana 4 del experimento se sacrificaron 5 animales diabéticos y 5 controles obteniendo así los grupos control 4 semanas (C4S) y diabéticos 4 semanas (D4S) y exactamente igual a la semana 12 obteniendo en este caso los grupos control 12 semanas (C12S) y diabéticos 12 semanas (D12S) (Figura 17). Con el objetivo de llevar un seguimiento adecuado del experimento se determinaron las glucemias y pesos de cada uno de los animales, dicho control se realizó de forma diaria a los grupos diabéticos y de forma semanal a los controles.

Por tanto los grupos de estudio obtenidos del experimento fueron los siguientes:

- **Control 4 semanas (C4S)**
- **Control 12 semanas (C12S)**
- **Diabéticos 4 semanas (D4S)**
- **Diabéticos 12 semanas (D12S)**

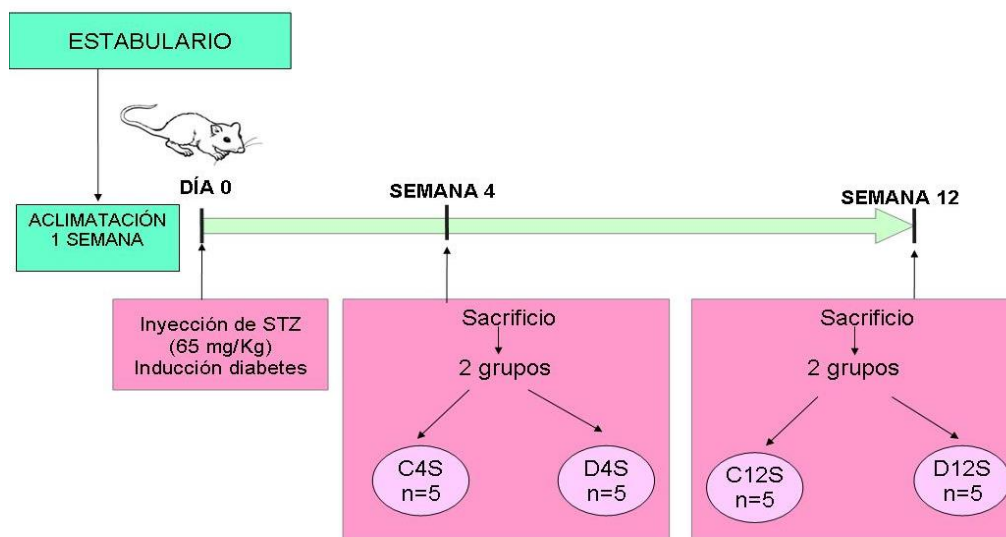


Figura 17: Línea temporal del experimento (Elaboración propia).

3. OBTENCIÓN Y PROCESADO DE LAS MUESTRAS

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). Una vez sacrificadas se procedió a la extracción del hipocampo el cual se conservó en el congelador de -80 °C para su posterior análisis.

3.1. ANÁLISIS BIOQUÍMICO

Como se ha explicado anteriormente las ratas fueron sacrificadas con una sobredosis de anestésico, a continuación, se procedió a la decapitación y disección del cerebro del animal para la extracción del hipocampo, nuestra muestra de estudio. Para el análisis de los parámetros bioquímicos del estudio las muestras fueron homogeneizadas introduciéndolas en un homogeneizador de vidrio, que contenía 1ml de tampón fosfato potásico 0,1 M, pH 7, a una temperatura de 4 °C. Inmediatamente después, se acidificaron 180 µl del homogenado con 20 µl de ácido perclórico (PCA) al 20 %. Se centrifugó a 12.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, se recogió el sobrenadante y se conservó a -20 °C hasta la determinación de la concentración de GSH. El resto del homogenado sin acidificar se centrifugó a 6.000 rpm durante 2 minutos a 4 °C, se recogió el sobrenadante e igualmente se conservó a -20 °C para la determinación de proteínas, MDA y la actividad de GPx. Los hipocampos que se seleccionaron para realizar el western blot (WB) fueron homogeneizados con el tampón de lisis (1 % tritonX-100, 50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl) suplementado con 1 mM de DTT, 10 mM NaF, 1 mM de Na₂VO₄ y 1x del inhibidor de proteasas Complete mini (Roche). Cuando ya estaban totalmente homogeneizados se incubaron durante 30 minutos a 4 °C, por último, se centrifugaron durante 20 minutos a 13.000 rpm, quedándonos el sobrenadante y preparando alícuotas de las cuales una se conservaba a -20 °C y el resto a -80 °C para generar un pequeño stock el cual se emplearía en función de la necesidad.

4. PROCEDIMIENTOS ANÁLITICOS Y TÉCNICAS

4.1. DETERMINACIÓN DE LA GLUCEMIA

Para la determinación de la glucemia se usó el aparato Accutrend® Sensor (Roche, Barcelona, España). Los niveles de glucosa en sangre se determinaron realizando una pequeña incisión en la cola. Empleando las tiras reactivas de glucemia Accu-Chek® Sensor Confort (Roche, Barcelona, España) se obtuvieron los valores de glucemia en sangre expresados en mg/dl.

4.2. DETERMINACION DE LA HEMOGLOBINA GLICOSILADA

- Fundamento del método:

Para la determinación de la hemoglobina glicosilada (HbA1c) se utilizó un test disponible comercialmente (Biosystems, Barcelona) consistente 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 eliminó la fracción lábil, las hemoglobinas fueron retenidas por una resina de intercambio catiónico, eluyéndose la HbA1c, previa eliminación por lavado de la HbA1a+b. La estimación del porcentaje de HbA1c se realizó por lectura de la absorbancia a 415 nm.

- Soluciones y reactivos empleados:

- 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.

- Procedimiento:

Para la determinación de la hemoglobina glicosilada se obtuvo sangre de rata, anestesiada y antes de su sacrificio, extrayéndola directamente del corazón con una jeringuilla. La sangre se almacenó en tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). La muestra en estas condiciones es estable 10 días a 2-8 °C.

En un tubo de ensayo se pipetearon 50 µl de sangre y 200 µl de solución 1. Se agito y se dejó a temperatura ambiente durante 10-15 minutos. De este hemolizado se tomaron 50 µl, los cuales se aplicaron cuidadosamente sobre el disco superior de la

columna. Una vez que hubo penetrado todo el hemolizado, se añadieron sucesivamente 200 μ l y 2 ml de la solución 2 y se dejó gotear, desechando el eluido. Se colocó la columna sobre un tubo de ensayo y se añadió 4 ml de la solución 3. Se recogió el eluido, que corresponde a la fracción de HbA1c. Se agitó el tubo de ensayo y se leyó la absorbancia de esta fracción (HbA1c) a 415 nm frente al agua destilada. Para la lectura de la absorbancia de la hemoglobina total (Hb TOTAL) se pipetearon en un tubo de ensayo 12 ml de la solución 3 y 50 μ l del hemolizado, se agitó y se leyó la absorbancia (Hb 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.

4.3. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO LOWRY

- Fundamento del método:

La determinación de proteínas se realizó según el procedimiento descrito por Lowry et al. (Lowry et al., 1951) con las modificaciones utilizadas de forma habitual en nuestro laboratorio (Peterson, 1977) y que se detallan a continuación.

El método consistió en la realización de una curva patrón de concentraciones crecientes de Albúmina sérica bovina (BSA). Tras la adición de las soluciones de trabajo y del reactivo de Folin, se midió la absorbancia (Δ) de cada uno de los tubos de ensayo en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 696 nm. La Δ_{696} es directamente proporcional a la concentración de proteínas, de modo que con los valores de absorbancia obtenidos para los distintos estándares se obtuvo la recta patrón y por interpolación se cuantificaron las concentraciones de proteínas de las muestras que estaban siendo analizadas.

- Soluciones y reactivos empleados:

- Solución 1: Na_2CO_3 al 4 % (Sigma-Aldrich, Madrid, España) + NaOH (Sigma-Aldrich, Madrid, España) al 0,8 % en 1 litro de agua bidestilada.
- Solución 2a: CuSO_4 a 1,25 mM (Guinama, Valencia, España), en 1 litro de agua bidestilada.
- Solución 2b: $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6$ a 1,42 mM (Sigma-Aldrich, Madrid, España), en 1 litro de agua bidestilada.
- Solución 3: Reactivo de Folin (Sigma-Aldrich, Madrid, España) diluido a 1 N.
- Solución 4: Estándar de 1 mg/ml de BSA (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

La solución 1+2 se prepara en el momento previamente a su uso.

- Solución 1+2: solución 1: solución 2ª: solución 2b (2:1:1) y solución 3: diluida 1:2 a 1 N.

- Procedimiento:

Se prepararon tubos de ensayo de la curva patrón con cantidades diferentes de la solución 4 (0, 10, 25, 50,75 y 100 µl) y se añadió agua bidestilada hasta un volumen de 200 µl. Los tubos de ensayo donde se añadieron las muestras contenían 15 µl de muestra y 185 µl de agua bidestilada. Tanto la curva patrón como las muestras se realizaron por duplicado. A continuación, a cada tubo de ensayo se le añadió 1 ml de la solución 1+2. Se agitó y se dejó reaccionar durante 10 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se añadieron 100 µl de la solución 3 a cada uno de los tubos de ensayo. Se agitó bien y se esperó durante 25 o 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se midió la absorbancia de cada uno de los tubos de ensayo con un espectrofotómetro, Genesys™ 20 (Thermo Scientific, Waltham, EE.UU.) 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 obtuvimos la recta patrón y por interpolación determinamos las concentraciones de proteínas de las muestras analizadas.

4.4. DETERMINACIÓN DE MALONDIALDEHÍDO

- Fundamento del método:

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

- Equipo y soluciones empleadas:

Para la determinación de la concentración de MDA se empleó un equipo de HPLC (Waters, Middleton, EE.UU.) que consta de los siguientes componentes:

- Bomba cromatográfica: Waters 1525 binary HPLC Pump.
- Detector: Waters 2475 Multi λ fluorescence.
- Inyector: Waters 717 plus Autosampler con bucle de 50 µL.

- Controlador: Multiport modelo RS.232.
- Ordenador: IBM Windows.
- Programa informático: Data System MT2.

La columna empleada fue la Kromasil C18 5 μm , 250 x 4,6 mm (Análisis Vínicos, Barcelona, España). Las condiciones del flujo fueron de 1 ml/min. La longitud de onda de excitación fue de 532 nm y la de emisión de 553 nm. El voltaje del detector de fluorescencia empleado fue de 600 voltios y el tiempo de respuesta de 2 segundos.

La preparación de las soluciones empleadas se realizó del siguiente modo:

La fase móvil se preparó con tampón fosfato 50 mM a pH 6 y metanol (mezclados en proporción 580 ml de tampón y 420 ml de metanol). Posteriormente, la fase móvil se filtró a través de un filtro-membrana de celulosa de 0,2 μm .

La solución madre de calibración se preparó previamente a su uso y se conservó a 4 °C. Dicha solución madre consiste en 20 mM de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (precursor del MDA) (Sigma-Aldrich, Madrid, España) en etanol absoluto para HPLC.

La solución de trabajo consiste en una preparación de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0,37 % (SigmaAldrich, Madrid, España) y ácido perclórico al 6,4 %, 2:1 v/v respectivamente. La solución de trabajo también se preparó de forma diaria previamente a su uso.

- Procedimiento:

En tubos con tapa de rosca de 2 ml se pipetearon 100 μl de la muestra y 750 μl de la solución de trabajo. A continuación, se mezcló bien y se mantuvo 60 minutos en un baño de agua a 95 °C. Pasado este tiempo se enfriaron los tubos en hielo (4 °C) durante 10 minutos con objeto de detener la reacción. Posteriormente se centrifugaron 10 minutos a 12.000 rpm y 4 °C. Hasta su inyección en el equipo HPLC los tubos se mantuvieron a una temperatura constante de 4 °C.

Puesto que el aducto MDA-TBA es inestable a pH neutro cada muestra se neutralizó 10 minutos antes de la inyección en el equipo de HPLC. Se añadieron aproximadamente 0,1 ml de hidróxido potásico 0,7 M (Sigma-Aldrich, Madrid, España) a 0,2 ml de la mezcla que acabábamos de centrifugar hasta obtener un pH de 6 el cual se comprobó aplicando unos microlitros de muestra en tiras de papel indicadoras de pH universal 1-11 (Macherey-Nagel, Hoerd, Francia). Una vez ajustado el pH centrifugamos durante 1 minuto para ayudar a precipitar sales insolubles que podrían interferir en la determinación y se procedió, previo filtrado con filtros de jeringa no

estériles de 0,2 μm (Sartorius Stedim Biotech, Madrid, España), a inyectar en el equipo de HPLC. Se colocó 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 era directamente proporcional a la concentración de MDA en la muestra, que se calculó por interpolación en la recta de regresión obtenida con los estándares.

4.5. DETERMINACION DE GLUTATIÓN

- Fundamento del método:

La determinación de GSH se realizó siguiendo el método de Reed et al. (Reed et al., 1980) según el cual el ácido iodoacético reacciona con los grupos tioles para formar derivados carboximetilos, a lo que le sigue una derivatización cromófora de los grupos amino con el reactivo de Sanger o 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno (DNFB) dando lugar a derivados 2,4-dinitrofenil (DNP; 2,4-dinitrophenyl). Estos derivados son rápidamente separados por HPLC, lo que permite la cuantificación de niveles nanomolares de GSH y aminoácidos relacionados. Los valores de GSH fueron referidos a las concentraciones de proteína determinadas por el método de Lowry et al. (Lowry et al., 1951).

- Equipo y soluciones empleadas:

Se ha empleado un equipo de HPLC (Gilson, Middleton, EE.UU) que consta de los siguientes componentes:

- Bombas para cromatografía Gilson 322.
- Detector: Gilson 156 UV/VIS.
- Lámpara UV/Visible.
- Desgasificador: Gilson 864.
- Autoinyector: Gilson 234 con bucle de 100 μl .
- Gilson serial Input/ Output Chanel (GSIOC).
- Ordenador: 486/50 Hz.
- Programa informático: Unipoint TM System.

La columna empleada para la determinación cromatográfica fue la Kromasil Amino 5 μm , 250 x 4,6 mm (Análisis Vínicos, Barcelona, España). Las condiciones iniciales del flujo empleadas fueron de 1,0 ml/min, con 80 % de fase A y 20 % de fase B. Estas

condiciones iniciales se mantuvieron durante 10 minutos, seguidas de un gradiente lineal hasta el 95% de fase móvil B durante 40 minutos y reequilibrado con las condiciones iniciales durante los 10 minutos previos al análisis de la siguiente muestra. La longitud de onda empleada fue de 365 nm. El rango del detector ultravioleta fue de 0,005 y el tiempo de respuesta de 5 segundos. Por último, la inyección de cada muestra se realizó de forma automática con un autoinyector con capacidad para 45 muestras.

La preparación de las soluciones empleadas se realizó del siguiente modo:

- Fase móvil A: 80 % de metanol HPLC (J.T. Baker ®, Deventer, Holanda) + 20 % agua HPLC (J.T. Baker ®, Deventer, Holanda).
- Fase móvil B: acetato de sodio 5 M (Sigma-Aldrich, Madrid, España) + ácido acético glacial (J.T. Baker ®, Deventer, Holanda) + agua calidad HPLC. Una vez disuelto lo anterior se diluye todo en 80 % de fase A.

Posteriormente, ambas fases se filtraron a través de un filtro-membrana de celulosa de 0,2 µm de poro (Sartorius Stedim Biotech, Madrid, España).

La solución madre de calibración se preparó diariamente y se conservó en nevera a 4 °C.

- Soluciones para la derivatización:

- Solución 1: 100 mM de ácido iodoacético (Sigma-Aldrich, Madrid, España) + 0,2 mM de m-cresol (Acros Organics, New Jersey, EE.UU). Esta solución permanece estable durante dos semanas tras su preparación y se conserva a 4 °C protegida de la luz.
- Solución 2: 10 M de KOH (Sigma-Aldrich, Madrid, España) + 3 M KHCO₃ (Sigma-Aldrich, Madrid, España), la cual permanece estable a 4 °C.
- Solución 3: 1-fluoro-2,4-dinitrobenzono (DNFB) (Sigma-Aldrich, Madrid, España) al 15 % v/v en etanol absoluto HPLC (J.T. Baker®, Deventer, Holanda), la cual se prepara previamente a su uso y se conserva a 4 °C protegida de la luz.

- Procedimiento:

En tubos eppendorf de 2 ml se pipetearon 200 µl de la muestra y 40 µl de la solución 1. El pH se ajustó a 8,5-9 al añadir 60 µl de la solución 2, tras este paso se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente se añadieron 200 µl de la solución 3 para formar los derivados 2,4-dinitrofenil (DNP).

Estos requieren un mínimo de 4 horas de oscuridad a 4 °C para su formación. Posteriormente se centrifugaron 10 minutos a 13.000 rpm y el sobrenadante se utilizó para el análisis en el equipo de HPLC. La cantidad de muestra mínima inyectada fue de 115 µl para tener la seguridad de llenar el bucle de 100 µl.

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

4.6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA GLUTATIÓN PEROXIDASA

- Fundamento del método:

La actividad de GPx se determinó según el método propuesto por Lawrence (Lawrence et al., 1978) frente a peróxido de hidrógeno, basado en las siguientes reacciones (Figura 18):

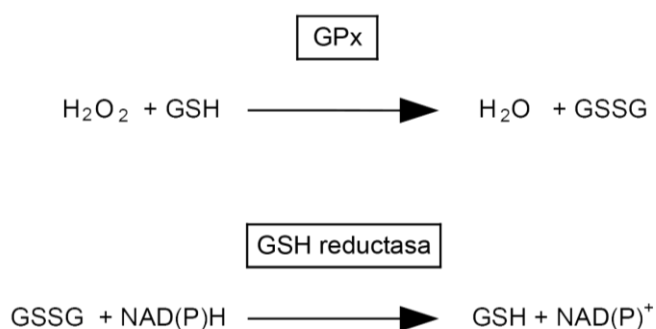


Figura 18: Actividad GPx (elaboración propia)

La formación del glutatión disulfuro está catalizada por la actividad de la enzima GPx de la muestra, el cual es a su vez, reducido de forma continua por un exceso de la actividad glutatión disulfuro reductasa presente en el medio. Esta reducción requiere la oxidación de NADPH, cuya desaparición se registra espectrofotométricamente utilizando una longitud de onda de 340 nm.

- Soluciones empleadas:

- Solución 1. Tampón fosfato potásico 0,1 M, pH 7,0, que contiene: EDTA 1 mM y azida sódica 1 mM.
- Solución 2. Glutación disulfuro reductasa 2,4 U/mL
- Solución 3. GSH 10 mM.
- Solución 4. NADPH 1,5 mM disuelto en NaHCO₃ al 0,1 %.
- Solución 5. Peróxido de hidrógeno 1,5 mM.

- Procedimiento:

El procedimiento analítico consistió en la adición de forma sucesiva a una microcubeta de 550 µl de la solución 1 (tampón fosfato potásico), 50 µl de muestra, 100 µl de la solución de glutación reductasa (solución 2) y 100 µl de la solución 3. Se preincubó esta muestra durante 5 minutos a 37 °C, tras lo cual se añadieron 100 µl de la solución 4. Se monitorizó durante 3 minutos el consumo de NADPH no dependiente de hidroperóxidos. Por último, se añadieron 100 µl de la solución 5 y se registró de nuevo la disminución de la absorbancia a 340 nm durante 5 minutos, que fue resultado del consumo de NADPH. El cálculo se realizó por la diferencia entre el consumo de NADPH antes y después de la adición de hidroperóxido.

$$C = Vf / \epsilon \times d \times Vm \times \Delta\Delta / \Delta t \text{ (mmolx L-1 x min-1)}$$

Vf = volumen final en mL

Vm = volumen de muestra en mL

ϵ = coeficiente de extinción molar (para el NADPH en estas condiciones es de 6.22 mM⁻¹ x cm⁻¹)

d = paso de luz de la cubeta (1 cm en nuestro caso)

$\Delta\Delta$ = disminución de la absorbancia a 340 nm

Δt = intervalo de tiempo considerado.

Los valores se expresan como nmol de NADPH consumidos por minuto y por mg de proteína.

4.7. ANALISIS DE PROTEÍNAS MEDIANTE LA TÉCNICA DE WESTERN BLOT

4.7.1. Determinación de proteínas por el método Bradford

- Fundamento del método:

Este método se emplea para cuantificar las proteínas de las muestras destinadas a WB y está basado en el método de Bradford (Bradford, 1976).

El método de Bradford es un método espectrofotométrico que consiste en la realización de una curva patrón de concentraciones crecientes de BSA. Tras la adición de las soluciones de trabajo, se mide la absorbancia a 595 nm ($\Delta 595$) de cada uno de los tubos de ensayo. La $\Delta 595$ es directamente proporcional a la concentración de proteínas, de este modo, con los valores de absorbancia obtenidos para los distintos estándares, se obtiene la recta patrón y por interpolación se cuantifican las concentraciones de proteínas de las muestras que están siendo analizadas.

- Soluciones y reactivos empleados:

- Estándar de 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de BSA (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Para desarrollar el protocolo se realizarán diluciones de este estándar.
- Dilución del estándar de 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de BSA a una dilución de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.
- Reactivo de trabajo: Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, Hércules, EE. UU) diluido 1:5 en agua bidestilada.

- Procedimiento:

La recta patrón de BSA y la de las muestras problema se prepararon por duplicado.

En primer lugar, se realizó una recta patrón de concentraciones conocidas de BSA (0, 0,5, 1,5, 10, 20, 50 μg). Se añadió una cantidad determinada de esta proteína y un volumen hasta 1 ml del reactivo de trabajo. Para cuantificar las proteínas de las muestras se añadieron 2 μl de muestra y hasta 1 ml del reactivo de trabajo y se incubó durante 5 min para que tuviera lugar la reacción. Transcurrido este tiempo se midió la absorbancia de la recta patrón y las muestras a 595 nm en un espectrofotómetro. Con los valores de absorbancia obtenidos, se cuantificaron las concentraciones de proteínas de las muestras ya que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de proteínas.

4.7.2. Técnica de Western blot

- Fundamento del método:

La metodología de WB empleada está descrita en el libro Current Protocols in molecular Biology (Gallagher et al., 2008). Este procedimiento consiste en la migración de proteínas del tejido fraccionado por medio de una electroforesis desnaturizante en geles de acrilamida (SDS-PAGE; sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis). Estas proteínas una vez que se han separado por su tamaño en el gel, se transfieren a una membrana de nitrocelulosa. La presencia de las proteínas se pone de manifiesto por medio de anticuerpos específicos ligados a un sistema de detección y visualización.

- Equipo empleado:

Para el revelado del WB se empleó el equipo ImageQuant™ LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences, Barcelona, España) cuyas bandas se cuantificaron después con el programa informático de análisis de imagen ImageJ 1.44 (http://imagej.nih.gov/ij; Java1.6.9_10 (32-bit)).

- Soluciones y reactivos:

- Acrilamida: solución de 40 % de acrilamida y bis-acrilamida, 37,5:1 (Bio-Rad, Hercules, EE.UU.).
- Tris (hidroximetil) aminometano (Sigma-Aldrich, Madrid, España).
- SDS (Sigma-Aldrich, Madrid, España).
- Glicina para electroforesis (Sigma-Aldrich, Madrid, España).
- Persulfato amónico (Sigma-Aldrich, Madrid, España).
- N, N, N, N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) (Bio-Rad, Hercules, EE.UU.).
- Tampón de electroforesis: 25 mM de Tris + Glicina 1,92 M + SDS al 0,1 %.
- Tampón de transferencia: 20 % de metanol+ 25 mM de Tris + Glicina 0,92 M
- Tampón de carga 1 X: 15 % SDS, 50 % glicerol (Sigma Aldrich, Madrid, España) y 0,1 % azul de bromofenol (Sigma Aldrich, Madrid, España).
- Marcador de peso molecular: SeeBlue® Plus2 pre-stained estándar (Invitrogen, Lifetech, Madrid, España).
- Colorante de proteínas: rojo Ponceau S (Sigma Aldrich, Madrid, España).

- PBS 0,01 M pH 7,2.
- PBS-tween 20 al 0,1 % (Q BIO gene, Carlsbad, EE.UU.).
- PBS-BSA 3 %-azida sódica al 0,01 % (Sigma-Aldrich, Madrid, España).
- Solución de bloqueo: 5 g de leche descremada en 100 ml de PBS-tween 20 al 0,1 %.
- Kit de revelado: Pierce® ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.).
- Solución de stripping: 200 mM de glicina para electroforesis con SDS al 0,4 %.

- Procedimiento:

1. Se prepararon los geles de acrilamida al porcentaje adecuado en función del peso molecular de la proteína a analizar. En nuestro caso se emplearon geles del 10-15 % de acrilamida y de 1 mm de grosor.

2. Las muestras se prepararon en función de la cantidad de proteínas obtenida por el método de Bradford descrito anteriormente (apartado 4.1.4.4.1.). De este modo, se empleó más o menos cantidad de muestra para finalmente cargar 75 µg de proteína total por cada una de las muestras. Se añadieron a las muestras tampón de carga 1 X y a continuación, las muestras se hirvieron a 95 °C durante 5 minutos y se centrifugaron durante 1 minuto a 13.000 rpm.

3. Las muestras se cargaron en los pocillos y la electroforesis vertical se realizó durante 60 minutos a 200 V con el sistema Bio-Rad Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad, Hercules, EE.UU.).

4. La transferencia a una membrana de nitrocelulosa Amersham™ Hybond ECL (GE Healthcare Life Sciences, Barcelona, España), se realizó con un equipo Mini PROTEAN 3 durante 60 minutos a 300 mA. Para comprobar el éxito en la transferencia, las membranas se tiñeron con la solución de rojo Ponceau, y después se lavaron 3 veces durante 10 minutos con PBS 0,01 M pH 7,2.

5. Las membranas se incubaron con solución de bloqueo durante 1 hora en agitación. A continuación, se lavaron con PBS-tween 20 al 0,1 %, 3 veces durante 10 minutos (excepto el último lavado que se realizó con PBS 0,01 M pH 7,2) y se incubaron de nuevo las membranas, esta vez con el anticuerpo primario (Tabla 4) diluido en PBS-BSA 3 %-azida sódica 0,01 %, durante toda la noche a 4 °C en reposo.

6. Al día siguiente, las membranas se lavaron de nuevo 3 veces durante 10 minutos con PBS-tween 20 al 0,1 % en agitación y se incubaron durante 1 hora en agitación con el anticuerpo secundario correspondiente que va unido a peroxidasa de rábano (HRP; horseradish peroxidase) diluido en solución de bloqueo (Tabla 1). Posteriormente, se realizaron de nuevo lavados en las mismas condiciones de los lavados previos a la incubación con el anticuerpo primario.

Tabla 1: Lista de anticuerpos utilizados para la técnica de WB. Se detalla la dilución a la que se ha usado, la especie donde se ha producido, la casa comercial y su referencia en el catálogo.

	Anticuerpo	Casa comercial	Descripción	Dilución	Referencia
PRIMARIOS	LC3	Cell Signaling	Policlonal de conejo	1:1000	#2775
	Beclin-1	Santa Cruz biotechnology	Policlonal de conejo	1:1000	SC-11427
	Lamp-2A	Invitrogen	Policlonal de conejo	1:1000	51-2200
	Atg5	Novus Biologicals	Policlonal de conejo	1:500	NB110-53818
	Nrf2	Santa Cruz biotechnology	Policlonal de conejo	1:200	SC-722
	GCLC	Abcam	Policlonal de conejo	1:1000	Ab53179
	β-Actina	Sigma	Monoclonal de ratón	1:30000	A3854
	SECUNDARIO	Anti Rabbit IgG-HRP(Fc)	Santa Cruz biotechnology	F(ab') ₂ de cabra	1:5000

7. Finalmente, se procedió a la detección por quimioluminiscencia con el kit de revelado (ECL 2) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las membranas fueron analizadas con un lector de imágenes por quimioluminiscencia (ImageQuant™ LAS 4000) y con el correspondiente programa informático de análisis de imagen (ImageJ 1.44).

En caso que quisiéramos emplear de nuevo la misma membrana para detectar una proteína diferente a la ensayada: tras el revelado se realizaban lavados con PBS 0,01 M pH 7,2 y las membranas se incubaban durante 20 minutos en suave agitación con la solución de stripping. A continuación, se podía proceder con las mismas a su lavado, bloqueo y pasos posteriores descritos anteriormente.

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. A continuación, se obtienen los estadísticos descriptivos media y desviación típica de los parámetros analizados para cada grupo. 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 HEMOGLOBINA GLICOSILADA

1.1. VARIACIÓN DEL PESO

En la Tabla 2 se muestran los valores del peso (expresados como media \pm desviación típica) al final del experimento en los diferentes grupos de estudio. Tanto en la Tabla 2 como en la Figura 19 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.

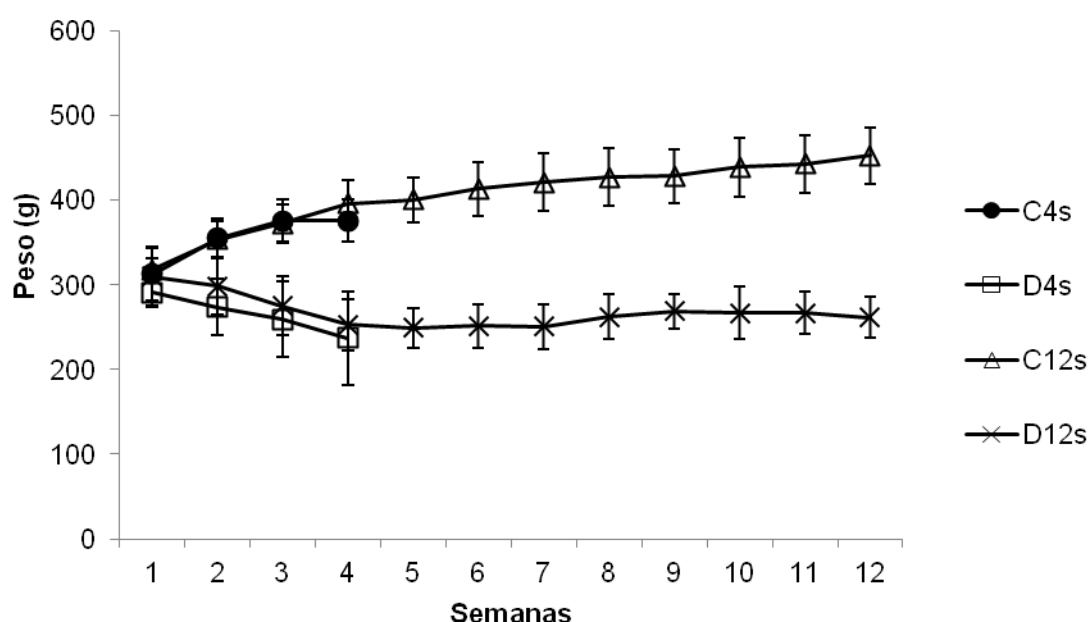


Figura 19: Evolución temporal del peso en los diferentes grupos del experimento.

1.2. ESTUDIO DE LA GLUCEMIA SANGUÍNEA

Tal y como se puede observar tanto en la Tabla 2 como en la Figura 20 donde se reflejan los valores de la glucemia sanguínea (expresados como media \pm desviación típica) de los diferentes grupos al final del experimento, en los grupos diabéticos existe un aumento estadísticamente significativo de los valores de glucemia en sangre (superiores 225 mg/dl) respecto a sus controles, lo cual es considerado como hiperglucemia. Los grupos control presentan valores de glucemia sanguínea normales (normoglucémicos).

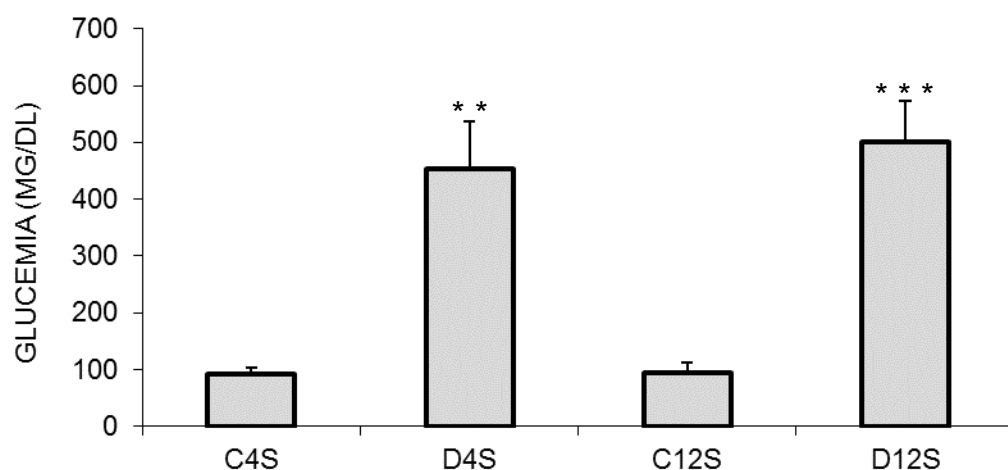


Figura 20: Variación de los valores de glucemia en los diferentes grupos del experimento. ** $p < 0,05$ vs C4S; *** $p < 0,05$ vs C12S.

1.3. ESTUDIO DE LA HEMOGLOBINA GLICOSILADA

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. Tanto en la Tabla 2 como en la Figura 21 se observa que los grupos diabéticos tienen valores de % HbA1c estadísticamente mayores que sus respectivos grupos control. Cabe destacar la homogeneidad de los valores entre los grupos controles y los diabéticos.

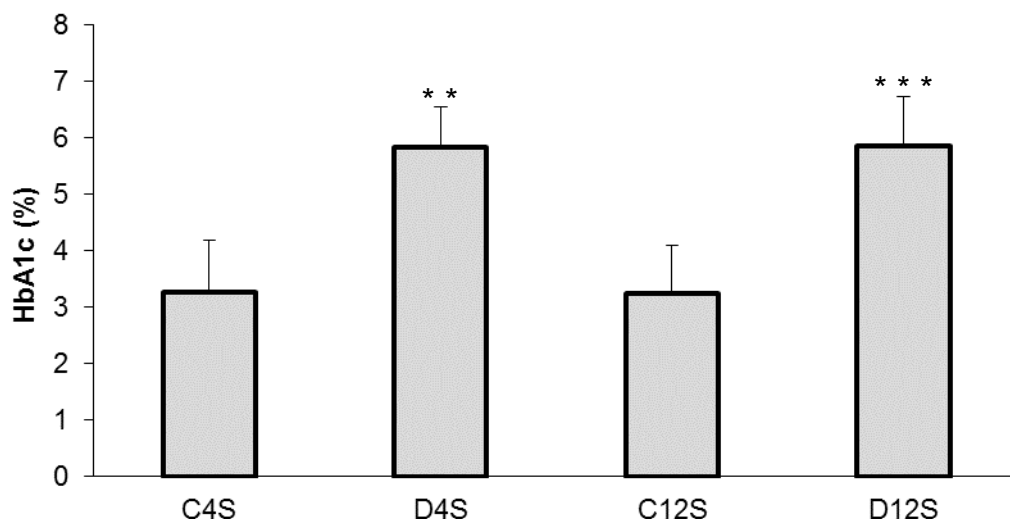


Figura 21: Variación de los valores de HbA1c en los diferentes grupos del experimento. ** $p < 0,05$ vs C4S; *** $p < 0,05$ vs C12S.

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 C4S; *** $p < 0,05$ vs C12S. El tamaño muestral de cada grupo fue como mínimo de $n = 5$.

GRUPO	Peso (g)	Glucemia (mg/dl)	% HbA1c
C4S	378,95 \pm 21,55	91,21 \pm 11,61	3,27 \pm 0,93
D4S	244,40 \pm 43,11**	453,19 \pm 84,47**	5,84 \pm 0,71**
C12S	445,76 \pm 35,17*	93,76 \pm 17,21	3,24 \pm 0,86
D12S	247,54 \pm 39,15	501,65 \pm 70,83***	5,86 \pm 0,87***

2. PARAMETROS BIOQUÍMICOS INDICADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO

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

En la Tabla 3 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.

Tabla 3: Parámetros bioquímicos obtenidos a partir del homogenado de hipocampo de todos los grupos al finalizar el experimento. En la tabla se muestra la concentración de MDA (nmol/mg proteína). * $p < 0,05$ vs todos los grupos. El tamaño muestral fue como mínimo de $n = 5$.

GRUPO	MDA (nmol/mg proteína)
C4S	0,45 \pm 0,03
D4S	0,53 \pm 0,06
C12S	0,35 \pm 0,16
D12S	0,78 \pm 0,19*

En la figura 19 se compara gráficamente la concentración de MDA en los diferentes grupos. Como se puede observar a las 4 semanas de diabetes no existen diferencias

estadísticamente significativas entre las ratas diabéticas y sus controles en cambio a las 12 semanas desde la inducción de la diabetes si que se observa un aumento estadísticamente significativo en la concentración de MDA en el grupo diabético respecto a su control.

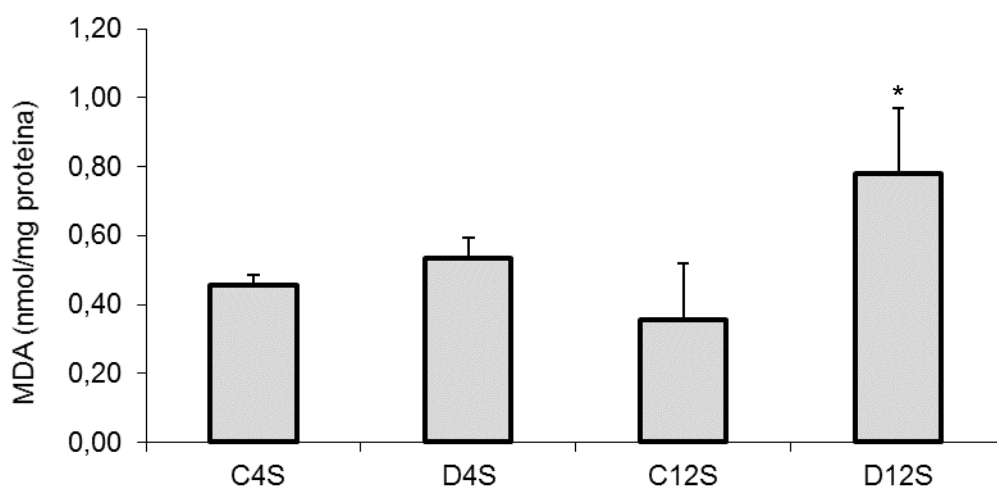


Figura 22: Comparación de la concentración de MDA (nmol/mg proteína) obtenida a partir del homogenado de hipocampo de todos los grupos al finalizar el experimento. * $p < 0,05$ vs todos los grupos

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

En la tabla 4 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.

Tabla 4: Parámetros bioquímicos obtenidos a partir del homogenado de hipocampo de todos los grupos al finalizar el experimento. En la tabla se muestra la concentración de GSH (nmol/mg proteína). * $p < 0,05$ vs C12S. El tamaño muestral fue como mínimo de $n = 5$.

GRUPO	GSH (nmol/mg proteína)
C4S	11,62 ± 5,75
D4S	14,15 ± 4,59
C12S	17,46 ± 2,19
D12S	10,61 ± 1,39*

En la Figura 23 se compara gráficamente la concentración de GSH en los diferentes grupos. Se puede observar que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las ratas diabéticas y sus controles a las 4 semanas del experimento en cambio a las 12 semanas en el grupo diabético se observa una disminución estadísticamente significativa de la concentración de GSH comparado con su grupo control.

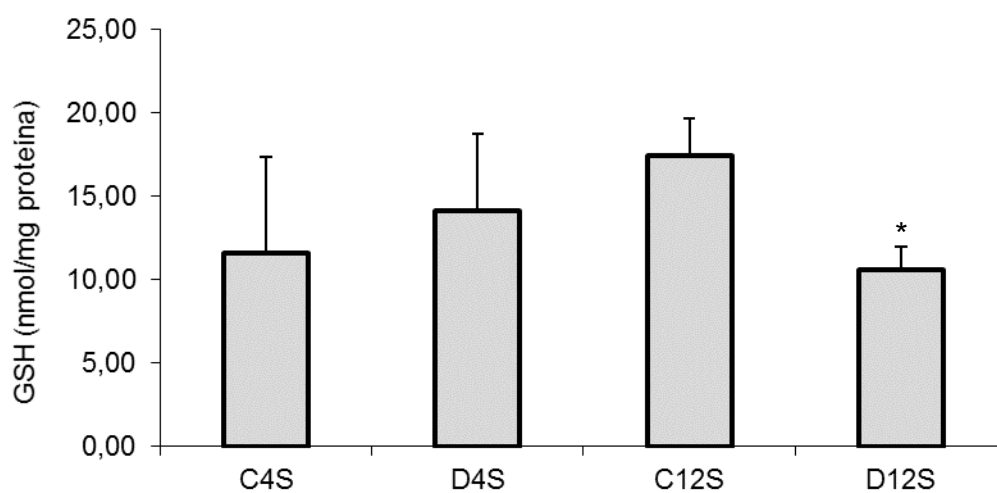


Figura 23: Comparación de la concentración de GSH (nmol/mg proteína) obtenida a partir del homogenado de hipocampo de todos los grupos al finalizar el experimento. * $p < 0,05$ vs C12S.

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

En la Figura 24 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 la cual es estadísticamente significativa. De manera que en aquellos animales que poseen un valor más elevado en la concentración de MDA, el valor de la concentración de GSH es menor.

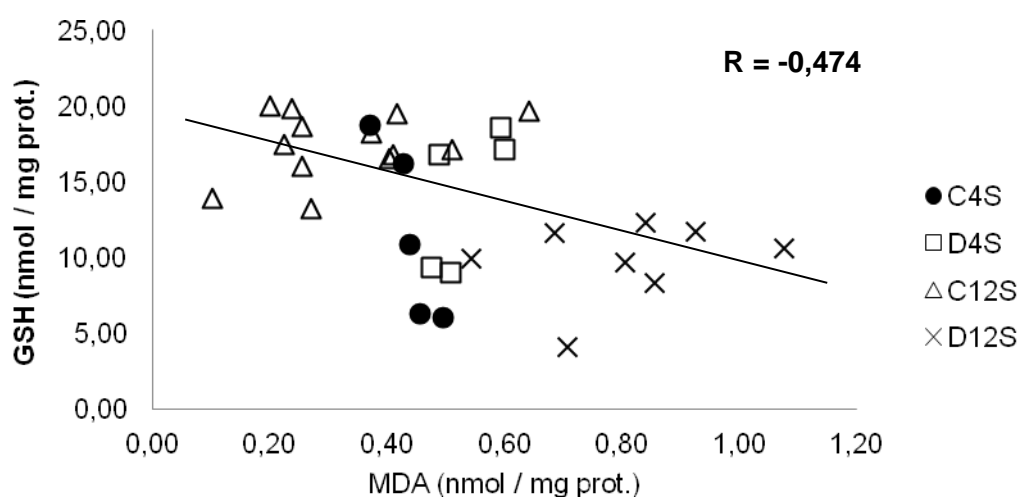


Figura 24: Correlación entre la concentración de GSH (nmol/mg proteína) y la concentración de MDA (nmol/mg proteína) en homogenado de hipocampo de todos los grupos de estudio.

2.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD GLUTATIÓN PEROXIDASA

En la Tabla 5 se muestran los valores de la actividad GPx (nmol/mg*min) obtenida 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.

Tabla 5: Parámetros bioquímicos obtenidos a partir del homogenado de hipocampo de todos los grupos al finalizar el experimento. En la tabla se muestra la actividad de GPx (nmol/mg.min). * $p < 0.05$ vs C4S. El tamaño muestral fue como mínimo de $n=5$.

GRUPO	GPx (nmol/mg.min)
C4S	26,72 ± 2,13
D4S	26,11 ± 4,25
C12S	61,65 ± 22,58 *
D12S	49,82 ± 1,13

En la Figura 25 se compara gráficamente la actividad de la GPx en los diferentes grupos. Se observa un aumento estadísticamente significativo de la actividad de la GPx en el grupo control 12 semanas respecto al grupo control 4 semanas (* $p < 0.05$ vs C4S). También se puede observar en la gráfica como el grupo diabetes 12 semanas presenta una tendencia a la disminución de la actividad de la GPx respecto a su control pero que no es estadísticamente significativa, lo cual podríamos atribuir a la alta desviación del grupo control 12 semanas.

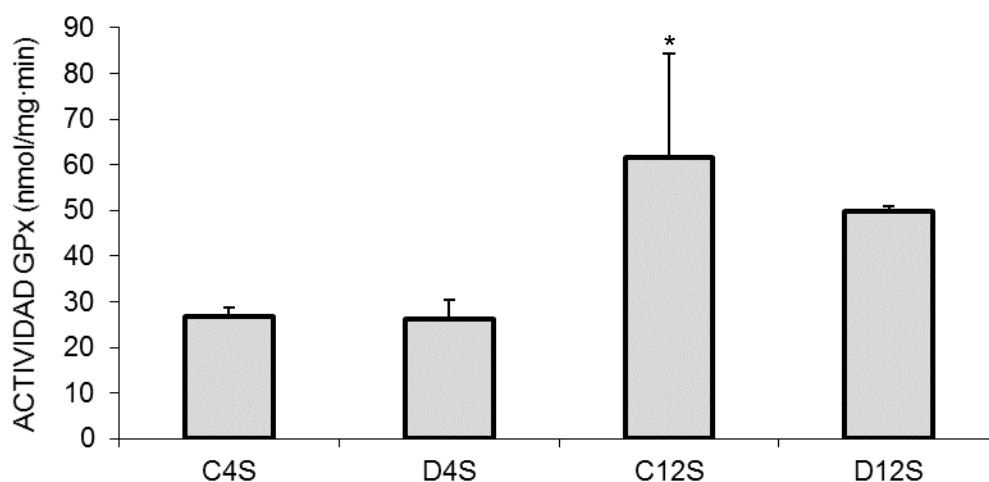


Figura 25: Comparación de la actividad GPx (nmol/mg*min) obtenida a partir del homogenado de hipocampo de todos los grupos al finalizar el experimento. * $p < 0.05$ vs C4S.

2.5. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE NRF2 EN HOMOGENADO DE HIPOCAMPO

La Figura 26 representa la imagen de WB y los valores obtenidos tras la cuantificación de la densidad de las bandas para la proteína NRF2 respecto a la Actina. Dichos valores hacen referencia a los diferentes grupos de estudio en las semanas 4 y 12 del experimento. Podemos observar un aumento estadísticamente significativo de los valores de densidad óptica de los grupos diabéticos (tanto a las 4 como a las 12 semanas del experimento) respecto a sus controles (& $p < 0.05$ vs C4S) (* $p < 0.05$ vs C12S). Respecto a la evolución temporal de la diabetes podemos observar en la Figura 26 que a las 12 semanas del experimento los valores de densidad óptica de NRF2 presentan una disminución estadísticamente significativa respecto a los grupos de 4 semanas (# $p < 0.05$ vs C4S, D4S).

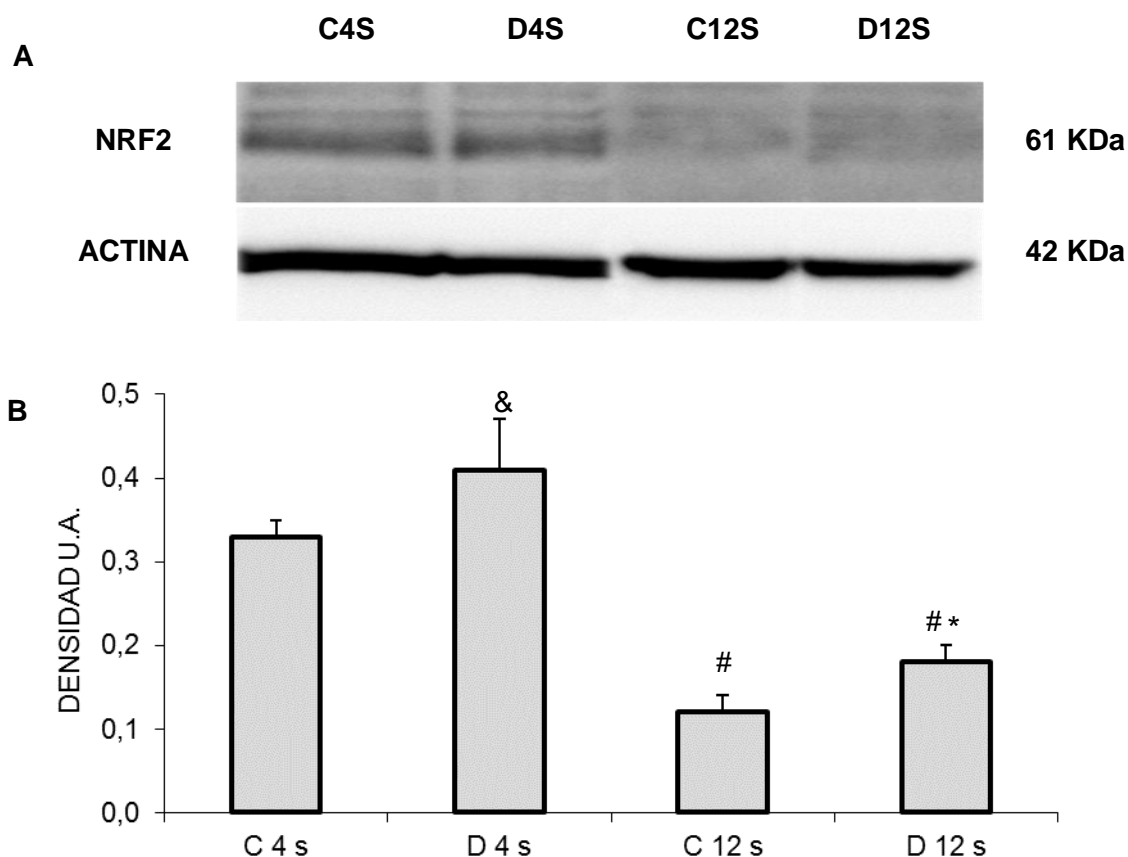


Figura 26: Detección de la proteína NRF2 por WB en los diferentes grupos de estudio a las 4 y 12 semanas. (A) Imagen del WB para la proteína NRF2 en cada grupo experimental (n=5 por grupo). (B) Gráfico de la cuantificación de la densidad óptica de las bandas (ratio de NRF2/Actina) en cada uno de los grupos experimentales. Las barras de error representan la desviación estándar de la media. & $p < 0,05$ vs C4S, * $p < 0,05$ vs C12S y # $p < 0,05$ vs C4S, D4S.

3. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS INDICADORES DE AUTOFAGIA

3.1. LC3

La Figura 27 representa la imagen de WB y los valores obtenidos tras la cuantificación de la densidad de las bandas para la proteína LC3 II respecto a la subunidad LC3 I. Dichos valores hacen referencia a los diferentes grupos de estudio en las semanas 4 y 12 del experimento. Existe un aumento estadísticamente significativo en los valores de densidad óptica de todos los grupos respecto al grupo control 4 semanas (* $p < 0,05$ vs C4S) y del grupo diabetes 12 semanas frente a diabetes 4 semanas (** $p < 0,05$ vs D4S).

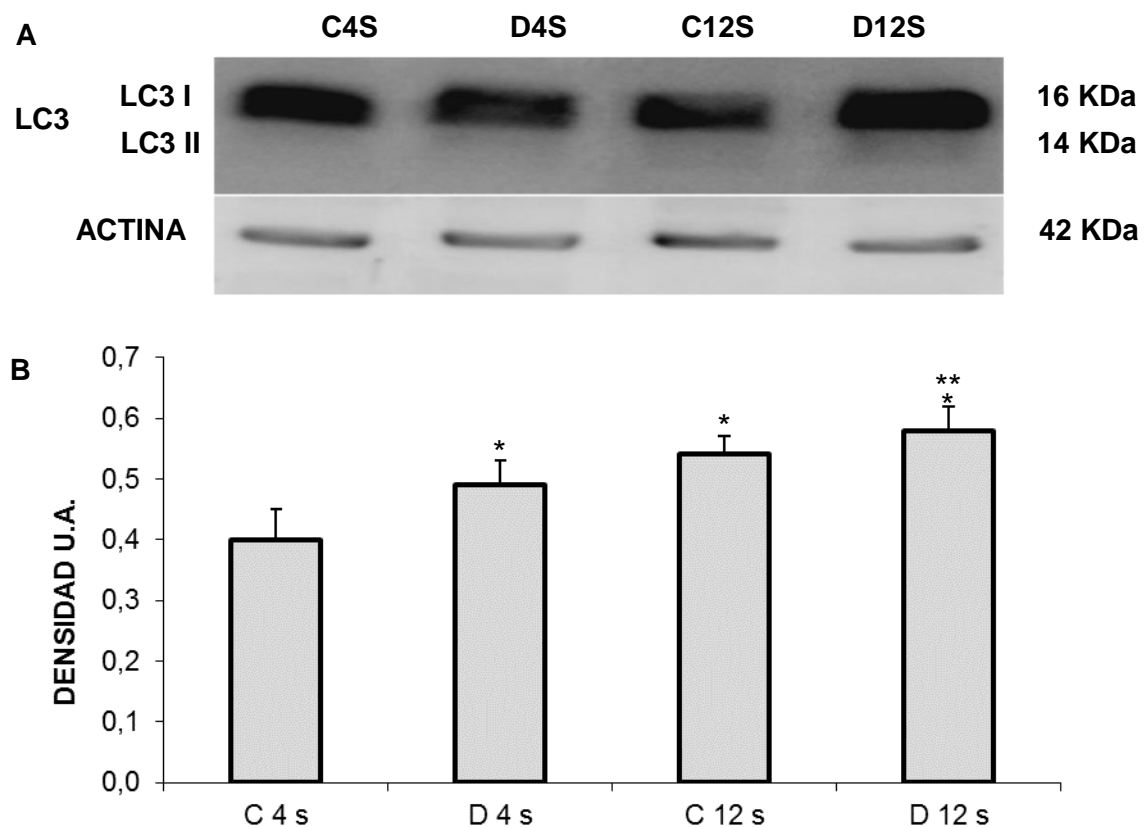


Figura 27: Detección de la proteína LC3 por WB en los diferentes grupos de estudio a las 4 y 12 semanas. (A) Imagen del WB para la proteína LC3 en cada grupo experimental (n=5 por grupo). (B) Gráfico de la cuantificación de la densidad óptica de las bandas (ratio de LC3II/LC3I) en cada uno de los grupos experimentales. Las barras de error representan la desviación estándar de la media. * $p < 0,05$ vs C4S y ** $p < 0,05$ vs D4S.

3.2. Atg5

La Figura 28 representa la imagen de WB y los valores obtenidos tras la cuantificación de la densidad de las bandas para la proteína Atg5 respecto a la Actina. Dichos valores hacen referencia a los diferentes grupos de estudio en las semanas 4 y 12 del experimento. Existe un aumento estadísticamente significativo en el valor de densidad óptica del grupo diabetes 4 semanas respecto al resto de grupos (* $p < 0,05$ vs C4S, C12S, D12S).

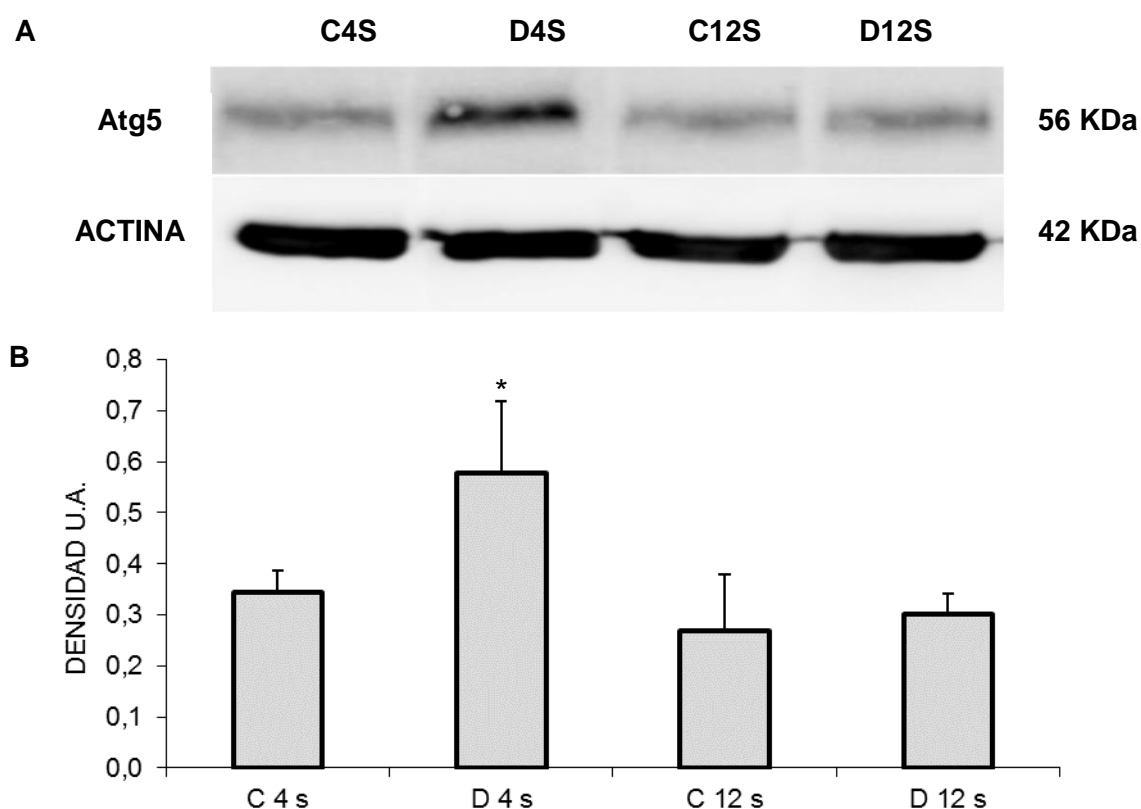


Figura 28: Detección de la proteína Atg5 por WB en los diferentes grupos de estudio a las 4 y 12 semanas. (A) Imagen del WB para la proteína Atg5 en cada grupo experimental (n=5 por grupo). (B) Gráfico de la cuantificación de la densidad óptica de las bandas (ratio de Atg5/Actina) en cada uno de los grupos experimentales. Las barras de error representan la desviación estándar de la media (* $p < 0,05$ vs C4S, C12S, D12S).

3.3. BECLIN1

La Figura 29 representa la imagen de WB y los valores obtenidos tras la cuantificación de la densidad de las bandas para la proteína Beclin1 respecto a la Actina. Dichos valores hacen referencia a los diferentes grupos de estudio en las semanas 4 y 12 del experimento. Existe un aumento estadísticamente significativo en los valores de densidad óptica de los grupos control y diabetes 12 semanas respecto a los grupos control y diabetes 4 semanas (* $p < 0,05$ vs C4S, D4S).

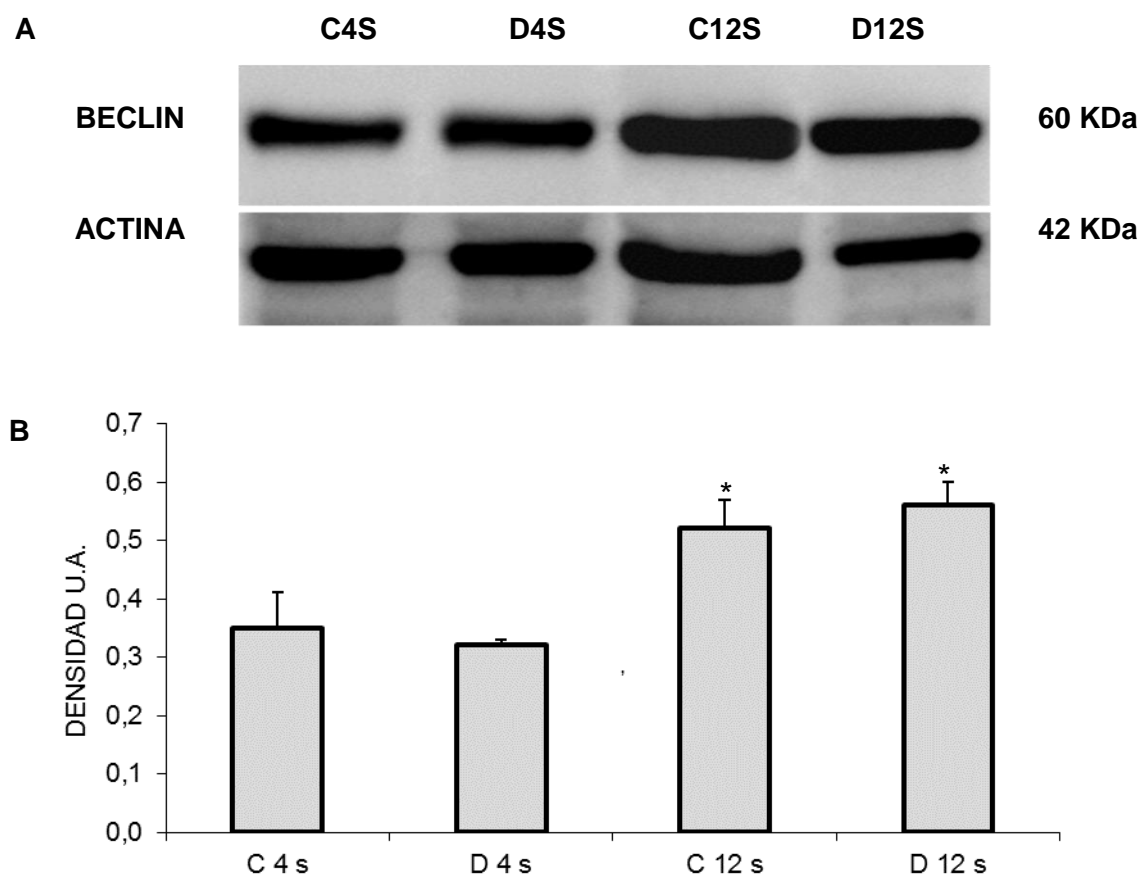


Figura 29: Detección de la proteína Beclin1 por WB en los diferentes grupos de estudio a las 4 y 12 semanas. (A) Imagen del WB para la proteína Beclin1 en cada grupo experimental (n=5 por grupo). (B) Gráfico de la cuantificación de la densidad óptica de las bandas (ratio de Beclin-1/Actina) en cada uno de los grupos experimentales. Las barras de error representan la desviación estándar de la media. * $p < 0,05$ vs C4S, D4S.

3.4. LAMP-2

La Figura 30 representa la imagen de WB y los valores obtenidos tras la cuantificación de la densidad de las bandas para la proteína LAMP-2 respecto a la Actina. Dichos valores hacen referencia a los diferentes grupos de estudio en las semanas 4 y 12 del experimento. No se han observado diferencias estadísticamente significativas en los valores de LAMP-2 en los diferentes grupos.

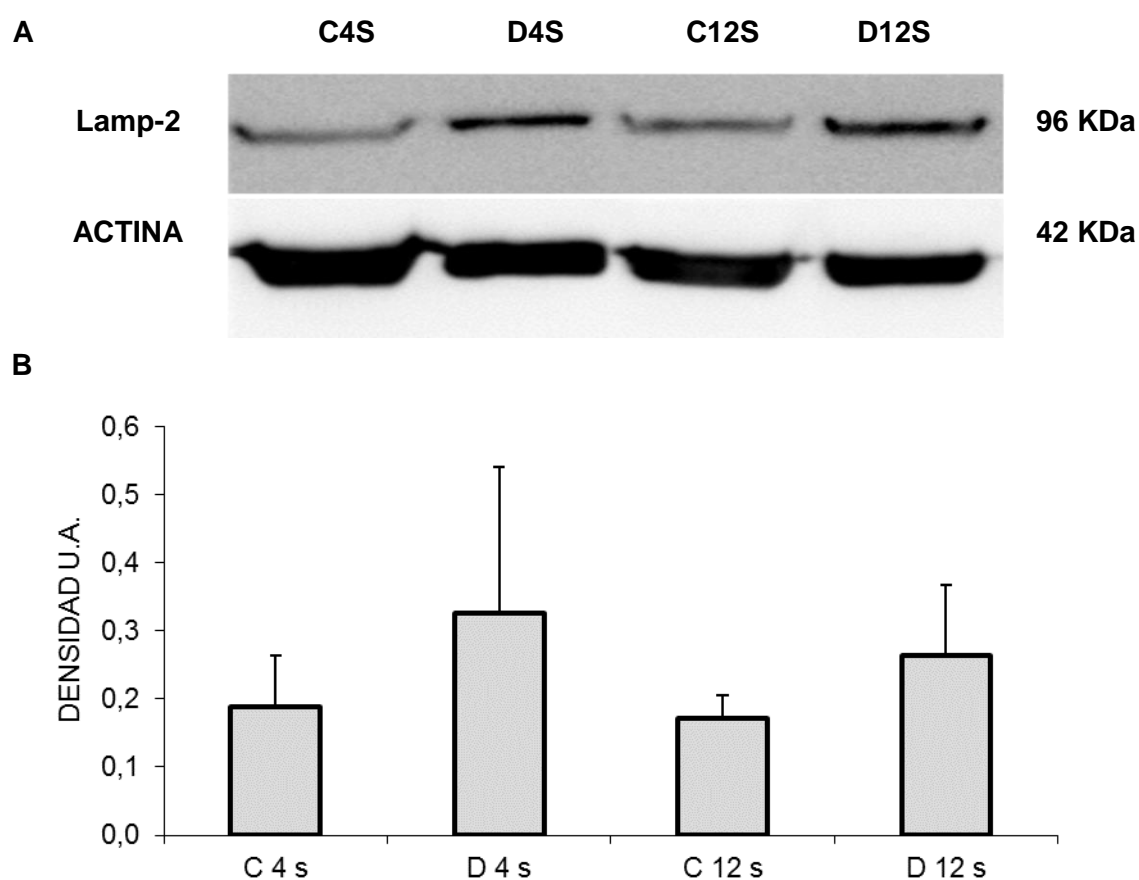


Figura 30: Detección de la proteína LAMP-2 por WB en los diferentes grupos de estudio a las 4 y 12 semanas. (A) Imagen del WB para la proteína LAMP-2 en cada grupo experimental (n=5 por grupo). (B) Gráfico de la cuantificación de la densidad óptica de las bandas (ratio de LAMP-2/Actina) en cada uno de los grupos experimentales. Las barras de error representan la desviación estándar de la media.

DISCUSIÓN

1. VARIABLES DESCRIPTIVAS DEL MODELO EXPERIMENTAL

El modelo de diabetes experimental empleado en el presente trabajo se encuentra dentro de aquellos modelos experimentales en los cuales la diabetes es inducida a través de una interrupción en la producción de la insulina (Shafir, 1997) simulando una diabetes tipo 1. La diabetes es inducida a través de una inyección intraperitoneal de STZ tratándose esta de un agente β -citotóxico (Farahna et al., 2016). La STZ es captada por las células del organismo a través del transportador de glucosa GLUT-2 presente en hígado, intestino, riñón y de forma muy abundante en las células β de los islotes de Langerhans (Kahraman et al., 2015). GLUT-2 no está presente en las células que forman la barrera hematoencefálica (Kumagai, 1999), por lo que podemos descartar un efecto directo de la STZ en el cerebro.

Al igual que ocurre con los pacientes diabéticos, las ratas diabéticas por STZ pueden sufrir complicaciones secundarias que afecten a diferentes órganos como pueden ser ojo, riñones, corazón, capilares sanguíneos y sistema nervioso central y periférico (Hammes et al., 1995; Kowluru et al., 2003; Schmeidel et al., 2003; Kuhad and Copra 2007; American Diabetes Association 2016; Palsamy and Subramanian, 2011).

Tras inyectarles STZ a los grupos diabéticos, se pudo observar a lo largo del experimento unos valores de glucemia superiores a 225 mg/dl. La valoración de los niveles de glucemia en sangre nos proporciona información sobre la existencia o no de hiperglucemia en los grupos diabéticos. Esta hiperglucemia se desarrolla principalmente por el efecto citotóxico que presenta la STZ sobre las células β del páncreas.

El porcentaje de HbA1c es otro de los marcadores que se emplea como indicador crónico de la hiperglucemia ya que aporta información del promedio de las concentraciones de glucosa en sangre de un periodo de tiempo de 2 o 3 meses. Tanto en la Tabla 2 de resultados como en la Figura 21 se puede observar un aumento estadísticamente significativo del porcentaje de HbA1c de los grupos diabéticos respecto a sus controles. El porcentaje de HbA1c se relaciona con las complicaciones micro y macrovasculares de la diabetes y se emplea como marcador estándar de la eficacia del control glucémico (Selvin et al., 2010).

En la Figura 19 como en la Tabla 2 también se muestran los valores del peso corporal de los grupos de estudio a las 4 y 12 semanas del experimento, observando una clara disminución del peso de las ratas diabéticas en comparación con sus controles tanto a las 4 como a las 12 semanas siendo un signo característico de la diabetes la

disminución del peso corporal provocada por la hiperglucemia (American Diabetes Association, 2010).

2. IMPLICACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA ENCEFALOPATÍA DIABÉTICA

Actualmente múltiples autores establecen como responsable de la afectación cerebral ocasionada por la diabetes el estrés oxidativo mediado por los RL (Beckman and Ames, 1998; Bonnefout-Rousselot, 2002). Una situación de hiperglucemia provoca una reducción de los niveles de antioxidantes y un aumento de la producción de RL, lo que contribuye a generar una situación de estrés oxidativo que puede ocasionar daños en diferentes tejidos de pacientes diabéticos y pudiendo verse afectadas diversas regiones cerebrales ocasionando anomalías morfológicas, alteraciones de la memoria (Fukui et al., 2001) y déficit cognitivo (Berr et al., 2000).

Bien es sabido que el cerebro es un órgano que presenta una elevada tasa de consumo de oxígeno por lo que se ve especialmente afectado por el estrés oxidativo, el acumulo de lípidos y la escasez de la presencia de enzimas antioxidantes en comparación con otros tejidos del organismo. Las neuronas son células especialmente sensibles a los ROS los cuales están implicados en muchos procesos neurodegenerativos como la diabetes (Jackson et al., 1994; Dugan et al., 1995; Yuan and Yankner, 2000). En situaciones normales existe un equilibrio entre la producción de ROS y las defensas antioxidantes de nuestro organismo pero se ha demostrado que el envejecimiento provoca un aumento del estrés oxidativo debido a una disminución en las enzimas antioxidantes (Bala et al., 2006).

Existen múltiples evidencias experimentales que apoyan el hecho 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). Bien es conocido que la diabetes provoca un acumulo de los productos derivados de la peroxidación lipídica como es el caso del MDA y un descenso en la defensa antioxidante del organismo (GSH), las enzimas catalasas, la SOD o la enzima responsable de su reducción a GSSG la GPx (Ogunyiuka et al., 2016). Son muchos los autores que han demostrado la relación existente entre el aumento de la producción de radicales libres y la disminución de las defensas antioxidantes con la disfunción cognitiva asociada a la diabetes (Mastrocola et al., 2005; Kuhad and Chopra, 2008). Evidencias documentadas recientemente sugieren que una situación de hiperglucemia prolongada promueve la sobreproducción de ROS en la mitocondria

lo que conduce en última instancia al estrés oxidativo (Tangvarasittichai, 2015; Matough et al., 2012; Giacco and Brownlee, 2010).

Las neuronas poseen una gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados en su membrana lo que las convierte en células especialmente sensibles a la peroxidación lipídica. La peroxidación de estos ácidos grasos provoca cambios en su estructura y disposición espacial dañando así su actividad biológica. La hiperglucemia es uno de los principales factores implicados en el estrés oxidativo y lo hace a través de la producción de los ROS o alterando el equilibrio redox (Bonfont-Rousselot, 2002), lo que se ha demostrado en estudios previos que aumenta la susceptibilidad de las neuronas y los astrocitos al daño provocado por la diabetes (Guyot et al., 2000).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con la bibliografía anteriormente citada ya que se puede observar aumento estadísticamente significativo de la concentración de MDA en el grupo diabetes 12 semanas respecto al resto de los grupos del estudio. Respecto a los niveles de GSH, en la tabla 4 y la Figura 23 observamos una disminución de la concentración de GSH en el hipocampo del grupo diabetes 12 semanas que resulta estadísticamente significativa respecto a su control. Se puede observar también que este aumento del MDA y descenso de GSH no es estadísticamente significativo a las 4 semanas de diabetes, cabría pensar que el aumento de la peroxidación lipídica y el descenso de las defensas antioxidantes tienen lugar en una fase tardía de la enfermedad.

La disminución de la concentración de GSH como el aumento en la concentración de MDA son parámetros indicativos de la presencia de estrés oxidativo en el hipocampo de ratas diabéticas. En la Figura 24 podemos observar la correlación existente entre ambos parámetros, de forma que si aumenta la concentración de MDA debido a un aumento de la peroxidación lipídica a su vez la concentración de GSH disminuye provocando así una pérdida de las defensas antioxidantes del organismo. En el caso de las enzimas antioxidantes del organismo que actúan como defensa frente al estrés oxidativo se ha estudiado la actividad de la GPx, la cual es la enzima responsable de transformar el GSH en GSSG actuando, así como mecanismo de defensa frente a los productos derivados de la peroxidación lipídica (MDA) y transformando H_2O_2 en agua. En los resultados obtenidos que se muestran en la Figura 25 podemos observar que aunque la diferencia no es estadísticamente significativa entre los grupos control 12 semanas y diabetes 12 semanas, cosa que se podría atribuir a la elevada desviación del grupo control 12 semanas, existe una tendencia a la disminución de la actividad de dicha enzima en el grupo diabético frente al control. Dicho resultado

confirma de esta forma que el estrés oxidativo provoca un descenso en la actividad de las enzimas antioxidantes y altera la homeostasis en el cerebro acompañado por un importante daño en las funciones dependientes del hipocampo. Similares resultados se han observado en estudios de Fukui y colaboradores (Fukui et al., 2001).

Existe una amplia investigación sobre el uso de diversos antioxidantes para reducir el daño cerebral y el déficit cognitivo asociado al estrés oxidativo provocado por la diabetes. Orsu Prabhakar estudió el efecto antioxidante del resveratrol sobre el cerebro de ratas diabéticas observando una reducción significativa de los niveles de MDA y SOD y un aumento significativo de la enzima catalasa en el grupo tratado con antioxidante otorgándole actividad protectora cerebral (Prabhakar, 2013). Otro ejemplo es el uso de la vitamina E como antioxidante ya que reduce el daño oxidativo en el hipocampo y por tanto mejora los déficits de aprendizaje y memoria (Fukui et al., 2002). Nuestro grupo de investigación ha estudiado en profundidad el campo del tratamiento con antioxidantes frente al estrés oxidativo. Se empleó la luteína como tratamiento coadyuvante en ratones donde se había inducido la diabetes con aloxana. Al final del experimento se observó que la luteína consiguió restablecer a valores control parámetros involucrados en el estrés oxidativo como el MDA. En el mismo estudio se observó que la luteína revertía la actividad de GPx y el contenido de GSH que disminuyeron en condiciones diabéticas (Muriach et al., 2006). También se observó que la administración de CR-6 protege la actividad de la GPx de la inhibición provocada por la glucosa después de 3 semanas de hiperglucemia inducida en ratones por aloxana (Miranda et al., 2007).

3. CAMBIOS MOLECULARES EN LA ENCEFALOPATÍA DIABÉTICA: FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN.

3.1. NRF2

El factor de transcripción nuclear eritroide NRF2 juega un papel citoprotector fundamental ya que es un activador transcripcional de múltiples genes antioxidantes, participando así en la defensa antioxidante, promoviendo la eliminación de ROS, xenobióticos, proteínas y orgánulos dañados, metales tóxicos etc. (McMahon et al., 2001; Kwak et al., 2003; Cho et al., 2005). Debido a la relación existente entre el estrés oxidativo y la diabetes y la capacidad que presenta NRF2 para activar los mecanismos antioxidantes de la célula y protegerla frente a posibles agentes

oxidantes como los ROS cabe esperar que la expresión de este pueda estar alterada en la diabetes.

Varios estudios demuestran que la expresión de NRF2 está disminuida en animales diabéticos en comparación con sus controles tanto a nivel del hipocampo (Ahshin-Majd et al., 2016), como en el nervio ciático (Negi et al., 2011) así como en la nefropatía diabética (Palsamy and Subramanian, 2011). Otros estudios demuestran que en enfermedades neurodegenerativas como son el Parkinson y el Alzheimer altos niveles de estrés oxidativo pueden verse contrarrestados por una regulación positiva de la vía de señalización de Nrf2 (Cuadrado et al., 2009).

La expresión de NRF2 también puede verse afectada por la edad, de forma que se ha observado que en la médula espinal y los astrocitos del sistema nervioso de ratones de edad avanzada los niveles de NRF2 están drásticamente disminuidos, de forma que esto contribuye a que los astrocitos presenten una mayor vulnerabilidad al estrés oxidativo. Del mismo modo que una menor neuroprotección pudiendo de esta forma relacionar la edad con el deterioro cognitivo (Duan et al., 2009).

En cuanto a los resultados obtenidos en el presente trabajo respecto a la expresión de NRF2 en el hipocampo de ratas diabéticas y basándonos en la bibliografía anteriormente citada, no son los que cabría esperar, ya que varios estudios demuestran que la expresión de NRF2 está disminuida en animales diabéticos respecto a sus controles debido a la disminución de la defensa antioxidante y el aumento del estrés oxidativo en situaciones de hiperglucemia. En el presente trabajo se observa un aumento estadísticamente significativo tanto en el grupo diabético 4 semanas como en el 12 semanas respecto a sus controles (Figura 26) pudiendo apoyar dicho resultado en el estudio de Cuadrado et al., donde el NRF2 presenta una regulación positiva aumentando su expresión en casos donde el estrés oxidativo es muy elevado, situación que puede aparecer en el caso de enfermedades neurodegenerativas como puede ser el caso de la encefalopatía diabética (Cuadrado et al., 2009)

En la Figura 26 también se observa una disminución estadísticamente significativa de los grupos 12 semanas (tanto control como diabético) respecto a los grupos 4 semanas (control y diabético). Esto concuerda con estudios previos donde se ha observado que con la edad la capacidad antioxidante del organismo se encuentra disminuida.

4. AUTOFAGIA: ESTUDIO DE MARCADORES DE AUTOFAGIA EN EL HIPOCAMPO DE RATAS DIABÉTICAS.

Una de las principales vías de la degradación intracelular de proteínas es la autofagia (Knecht et al., 2009). El objetivo final de esta vía de degradación es mantener la homeostasis celular y se caracteriza por estar altamente regulada por diferentes vías de señalización moduladas por diferentes estímulos. La autofagia está activada en situaciones de estrés nutricional, oxidativo y otras formas de estrés (Boya et al., 2013). Está demostrado que una degradación anómala de proteínas está relacionada con diferentes patologías entre otras con enfermedades neurodegenerativas como puede ser el Alzheimer (Ihara et al., 2012), el Parkinson (Ebrahimi-Fakhari et al., 2012) o con el déficit cognitivo asociado a la diabetes debido a un metabolismo inadecuado de la glucosa (Biessels et al., 1994).

La autofagia es un proceso altamente dinámico y con varias fases, que incluye la formación de la membrana pre-autofagosomal, su nucleación para formar el autofagosoma, la fusión del autofagosoma con los endosomas y lisosomas para formar el autolisosoma y la degradación de su contenido (Knecht et al., 2009).

En este estudio se ha tratado de determinar la evolución de la autofagia en el hipocampo de ratas diabéticas y para ello se han seleccionado tres marcadores macroautofagicos (LC3, Atg5 y Beclin1) y un marcador para la CMA (LAMP-2).

4.1. LC3

Uno de los procesos más importantes de la autofagia es la formación del autofagosoma para ello se cuantifica la proteína LC3, en su forma lipídada conocida como LC3 II proceso el cual está mediado por la proteína Atg7. La determinación de la cantidad de LC3 II informa sobre la formación de autofagosomas, ya que LC3-II es prácticamente la única proteína cuya localización es específica en la membrana del autofagosoma (Klionsky et al., 2008; Klionsky et al., 2012).

En los resultados del presente trabajo se observa un aumento estadísticamente significativo en los niveles de densidad óptica del ratio LC3II/LC3 I de los grupos control y diabetes 12 semanas y diabetes 4 semanas respecto al grupo control 4 semanas. Resultado muy similar al que obtuvieron en el estudio realizado en el hipocampo de ratas diabéticas, Ma et al., donde los niveles de LC3 analizados también eran significativamente más elevados en los grupos diabéticos con respecto al control (Ma et al., 2011). Estos resultados permiten demostrar en nuestro modelo experimental que la autofagia está activada en el hipocampo de ratas diabéticas.

Además los niveles del ratio LC3II/LC3I se incrementaron en los grupos diabéticos de una manera dependiente del tiempo observando que existe un aumento estadísticamente significativo entre el grupo diabetes 12 semanas y diabetes 4 semanas.

Se sabe que el hipocampo es el área del cerebro que regula la memoria y el aprendizaje, cambios en su estructura o la pérdida de neuronas puede alterar su función dando lugar a un deterioro de la memoria (Ma et al., 2011; Sadeghi et al., 2016). Investigadores han demostrado que las ratas con DM presentan cambios estructurales y funcionales en el cerebro (Sadeghi et al., 2016).

4.2. Atg5

La autofagia es un proceso que ocurre de manera basal en la célula pero hay diferentes situaciones como puede ser una situación de estrés que puede conducir a una sobreexpresión del proceso. La privación de nutrientes es el principal estímulo en la inducción de la autofagia siendo la proteína mTor uno de los sensores que detecta dicha privación, permitiendo regular negativamente la autofagia (Gunn and Hailes, 2008; Ballou and Liu, 2008). La función reguladora de mTor sobre la autofagia está relacionada con cambios en los niveles de sus proteínas blanco, unas de estas proteínas son las proteínas Atg. En las diferentes etapas del proceso autofagico como son la inducción, iniciación, elongación, maduración y fusión del autofagosoma intervienen dichas proteínas. Un ejemplo es la proteína Atg13 cuyo estado de fosforilación es controlado por mTor de forma que en condiciones de abundancia de nutrientes Atg13 se encuentra hiperfosforilado de manera que la autofagia se encuentra reprimida (Kabeya et al., 2005a). De forma contraria durante la privación de nutrientes Atg13 se encuentra hipofosforilada lo que le permite interactuar con Atg1 activando así toda la cascada del proceso autofágico (Lee et al., 2007; Kabeya et al., 2005b; Cheng et al., 2008). El desarrollo o formación de la vacuola autofágica puede ocurrir a través de dos vías distintas de conjugación, las cuales transcurren de forma paralela. Una es la interacción de Atg12 con Atg7 y la otra Atg8 con Atg4. Formándose finalmente el complejo Atg12-Atg5-Atg16 el cual se unirá a LC3 iniciándose así la formación de la vacuola autofágica (Klionsky, 2008).

En los resultados obtenidos se puede observar un aumento estadísticamente significativo de la expresión de Atg5 en el grupo diabetes 4 semanas con respecto al resto de grupos de estudio, lo que nos podría llevar a afirmar que en el presente modelo experimental existe un aumento de las fases iniciales del proceso autofágico y

que este incremento es mayor en los grupos diabéticos. A las 12 semanas no existen diferencias significativas entre los grupos pero se puede observar un ligero aumento en la expresión de Atg5 del grupo diabetes 12 semanas respecto a su control. Actualmente no existen muchos estudios que relacionen directamente un aumento en la expresión de las proteínas “Atg” con el daño neuronal que puede provocar la diabetes pero se ha demostrado que en situaciones de hiperglucemia se produce un aumento del estrés oxidativo y por tanto la producción de ROS (Bonnefout-Rousselot, 2002) que pueden a través de diferentes vías sobreestimar el proceso autofágico.

4.3. BECLIN1

En la formación del autofagosoma está implicado el complejo PI3K (fosfatidilinositol-3-quinasa) cuya función exacta es desconocida pero se sabe que es necesario ya que las proteínas Atg18, Atg2 y Atg9 se unen a dicho complejo favoreciendo la curvatura y la nucleación de la membrana del autofagosoma. El complejo PI3K está formado por las proteínas PI3K, Beclin1, p150 y Barkor, siendo especialmente destacable el papel que desempeña Beclin1. Beclin1 presenta un dominio BH3 el cual tiene un papel regulador sobre la autofagia de forma que en condiciones donde hay abundancia de nutrientes las proteínas Bcl-2 y Bcl-XL, se unen al dominio BH3 que presenta Beclin1 lo que reduce su actividad proautofágica. De forma contraria en situaciones de ayuno esta unión no se ve favorecida aumentando entonces la actividad autofágica de Beclin1.

Existen diferentes vías de regular dicha unión destacando entre ellas la fosforilación de Bcl2 o Beclin1. Estas fosforilaciones rompen la unión de Bcl2 y Beclin1 permitiendo que Beclin1 se una al complejo PI3K y se induzca la autofagia (Kang et al., 2011).

Otras proteínas que pueden unirse también a Beclin1 facilitando la formación de los autofagosomas pueden ser, Barkor, que se une a la membrana del autofagosoma (Matsunaga et al., 2009); UVRAG, presente en endosomas, que mantiene la estabilidad de Beclin1 y activa a la PI3K de clase III (Takahashi et al., 2007); y Vmp1, que induce la conversión de LC3-I a LC3-II (Vaccaro et al., 2008).

En el estudio de Ma et al., 2016 se observó que en el hipocampo de ratas diabéticas a las 8, 10 y 12 semanas desde la inducción de la diabetes, los niveles de Beclin1 aumentaban en relación al tiempo de diabetes y en comparación con el grupo control. Este y otros hallazgos les permitieron afirmar que la DM activaba la autofagia y que la función de los lisosomas se veía afectada, pudiendo relacionar estas alteraciones con el deterioro cognitivo asociado a la diabetes debido al depósito de la proteína β -amiloide. En este estudio se observó también que conforme transcurría el tiempo

los marcadores de autofagia LC3 y Beclin1 aumentaban. Nuestros resultados concuerdan con la bibliografía anteriormente citada ya que se puede observar en las Figura 27 y 29 un aumento estadísticamente significativo de la expresión de ambas proteínas en los grupos de 12 semanas respecto a los grupos de 4 semanas.

También se ha visto que en situaciones de hiperglucemia se produce un estrés del retículo endoplásmico lo que puede activar una de las vías de fosforilación de Bcl2 más concretamente JNK-1. Al fosforilar a Bcl2 se inhibe la unión de esta a Beclin1 favoreciendo por tanto la autofagia.

Basándonos en la bibliografía detallada anteriormente podemos ver que en nuestros resultados los niveles de la expresión de Beclin1 es mayor en el grupo diabetes 12 semanas respecto al control y diabético 4 semanas y que aunque no es estadísticamente significativo se puede observar también una ligera tendencia a aumentar la expresión de dicha proteína en el grupo diabetes 12 semanas respecto a su control. Al igual que en los estudios de Ma y colaboradores podríamos suponer que en nuestro modelo experimental existe una mayor actividad autofágica en los grupos diabéticos con respecto al control y que dicha actividad parece que aumenta con el paso del tiempo.

4.4. LAMP-2

Como se ha mencionado con anterioridad existen tres tipos de autofagia: la microautofagia, la macroautofagia o autofagia propiamente dicha y CMA. La CMA consiste en la degradación específica de proteínas que presentan la secuencia específica formada por el pentapéptido KFERQ el cual está presente en el 30% de las proteínas (Kiffin et al., 2004; Dice et al., 2003). Las proteínas que son degradadas a través de CMA son reconocidas en el citosol por la chaperona Hsc70 (Chiang et al., 1989), que dirige el sustrato hacia la membrana lisosomal donde interacciona con la proteína transmembrana LAMP-2. El sustrato en una conformación desplegada atraviesa la membrana del lisosoma donde participan otras chaperonas y una isoforma de Hsc70 situada en la luz del lisosoma (Agarraberes et al., 1997). Una vez dentro el sustrato es degradado por catepsinas presentes en el interior del lisosoma.

Aunque en la mayoría de células existe una actividad basal CMA se ha demostrado que el estrés nutricional puede aumentar la actividad de esta vía de forma considerable (Cuervo et al., 1995; Agarraberes et al., 1997; Cuervo and Dice, 2000).

Muchos estudios relacionan la actividad de CMA con la edad de forma que en muchos de ellos la actividad de la autofagia mediada por chaperonas se ve disminuida con el tiempo. Muchas de las proteínas relacionadas con enfermedades neurodegenerativas como puede ser el caso del Alzheimer o Parkinson presentan la secuencia específica KFERQ, secuencia necesaria para que se active la CMA, de forma que el envejecimiento y la falta de actividad CMA contribuye a la falta de degradación de estas proteínas y a la formación de agregados. Por lo tanto, la pérdida de actividad CMA con el envejecimiento tiene implicaciones importantes para la formación de agregados de proteínas y la patogénesis global en estas enfermedades neurodegenerativas (Koga and Cuervo, 2011). En el apartado de resultados, en la Figura 30 se puede observar una reducción en la expresión de la proteína LAMP-2 en los grupos de 12 semanas respecto a los grupos de 4 semanas. Aunque esta reducción no es estadísticamente significativa, se podría relacionar con la edad de los animales de experimentación. Además, la pérdida de la actividad de la CMA según los estudios de Koga y Cuervo podría provocar el acumulo de agregados de proteínas en el cerebro asociando este depósito al déficit cognitivo que presentan algunos pacientes diabéticos tipo 2 como consecuencia de diversos factores como son la resistencia a insulina, la dislipemia, la hipertensión y la enfermedad cerebrovascular (McCrimmon et al., 2012) y al mayor riesgo de padecer encefalopatía diabética.

Por el contrario existen estudios *in vitro* donde se ha observado un aumento de la actividad CMA debido a defectos en la macroautofagia (Kaushik et al., 2008). Rodríguez-Muela N et al. demostraron que la actividad CMA aumenta con la edad mediante el análisis de los niveles de Lamp2 (Rodríguez-Muela et al., 2013)

Ma y colaboradores (Ma et al., 2016) observaron que tras inducir la diabetes con STZ en ratas, se producía una activación de la autofagia debido a un incremento de las proteínas LC3 y Beclin1, en cambio en el caso de la CMA donde determinaron la expresión de LAMP-2 observaron que aunque a las 12 semanas de inducir la diabetes se producía una disminución de los niveles de LAMP-2 en el grupo diabético frente al control, cosa que atribuyen a una alteración de la función lisosomal, a las 8 y 10 semanas estas diferencias no eran significativas. Estos resultados no se corresponden con lo observado en el presente trabajo. Como se puede observar en la figura 27 del apartado de resultados, los grupos diabéticos tanto a las 4 como a las 12 semanas presentan una tendencia al aumento de los niveles de LAMP-2 respecto a sus controles aunque dicho incremento no es estadísticamente significativo. Tal vez la discrepancia entre ambos estudios se podría atribuir a diferencias en la metodología empleada.

CONCLUSIONES

Tras los resultados obtenidos en el presente trabajo podemos concluir que en el hipocampo de un modelo experimental de diabetes existen cambios moleculares causados por un aumento del estrés oxidativo y un desequilibrio en la vía autofágica de degradación de proteínas. Además dichos cambios pueden estar afectados por la progresión temporal de la diabetes. Concretamente:

1. Se observa una situación de estrés oxidativo determinado por un descenso de la concentración de GSH y un incremento de la concentración de MDA en el hipocampo de la rata diabética respecto su control. Esta alteración parece llevar una progresión temporal ya que a las 4 semanas no se observa dicha alteración y sí a las 12 semanas de diabetes.

2. Existe un incremento estadísticamente significativo del factor de transcripción NRF2 en el hipocampo de las ratas diabéticas en comparación con sus controles, tanto a las 4 como a las 12 semanas. Dicho incremento es probablemente debido a una regulación positiva debido a la situación de estrés oxidativo.

3. Existe una alteración del proceso autofágico en nuestro modelo experimental de diabetes reflejado por un aumento estadísticamente significativo de la expresión de las proteínas LC3, Atg 5 en el grupo diabético a las 4 semanas de diabetes y de Beclin a las 12 semanas de diabetes. En cambio, no se han observado cambios significativos en la expresión LAMP-2, característica de la autofagia mediada por chaperonas.

BIBLIOGRAFÍA

- Agarraberes F, Terlecky SR, Dice JF (1997). An intralysosomal hsp70 is required for a selective pathway of lysosomal protein degradation. *J. Cell Biol.* 137: 825–834.
- Ahshin-Majd S, Zamanib S, Kiamarib T, Kiasalaria Z, Baluchnejadmojarad T, Roghania M (2016). Carnosine ameliorates cognitive deficits in streptozotocin-induced diabetic rats: Possible involved mechanisms. *Peptides* 86: 102-111.
- Altman J and Das GD (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol.* 124: 319-335.
- Alvarez-Nölting R, Arnal E, Barcia JM, Miranda M, Romero FJ. (2011). Protection by DHA of early hippocampal changes in diabetes: possible role of CREB and NF-kappaB. *Neurochem Res.* 37: 105-115.
- Amaral DG (1978). A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *J Comp Neurol.* 182: 851-914.
- Amaral DG, Witter MP (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31: 571-591.
- Amaral DG, Witter MP (1995). Hippocampal formation. In G. Paxinos (ed.): *The Rat Nervous System*. San Diego, Acad. Press Inc. 5: 443-493.
- American Diabetes Association (2010). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* Jan; 33(Supplement 1): S62-69.
- American Diabetes Association (2012). *Diabetes Care* Jan; 35 (Supplement 1): S11-S63.
- American Diabetes Association (2016). *Diabetes Care* Jan; 39 (Supplement 1): S13-S22.
- American Diabetes Association (2016). *Diabetes Care* Jan; 39 (Supplement 1): S23–S35.
- Aragno M, Brignardello E, Tamagno E, Gatto V, Danni O, Boccuzzi G (1997). Dehydroepiandrosterone administration prevents the oxidative damage induced by acute hyperglycemia in rats. *J Endocrinol.* 155: 233-240.
- Aragno M, Mastrocola R, Brignardello E, Catalano M, Robino G, Manti R, Parola M, Danni O, Boccuzzi G (2002). Dehydroepiandrosterone modulates nuclear factor-kappaB activation in hippocampus of diabetic rats. *Endocrinology* 143: 3250-3258.
- Asvold BO, Sand T, Hestad K, Bjorgaas MR (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.
- Auer RN (2004). Hypoglycemic brain damage. *Metab Brain Dis.* 19: 169-175.
- Awad N, Gagnon M, Messier C (2004). The relationship between impaired glucose tolerance, type 2 diabetes, and cognitive function. *J Clin Exp Neuropsychol.* 26: 1044-1080.

Axe EL, Walker SA, Manifava M, Chandra P, Roderick H, et al. (2008). Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* 182: 685-701.

Ayala A, Munoz MF, Arguelles S (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity* 360438.

Aye T, Reiss AL, Kesler S, Hoang S, Drobny J, Park Y, Schleifer K, Baumgartner H, Wilson DM, Buckingham BA (2011). The feasibility of detecting neuropsychologic and neuroanatomic effects of type 1 diabetes in young children. *Diabetes Care* 34: 1458-1462.

Bala K, Tripathy BC, Sharma D (2006). Neuroprotective and anti-ageing effects of curcumin in aged rat brain regions. *Biogerontology* 7: 81–89.

Ballou LM and Lin RZ (2008). Rapamycin and mTOR kinase inhibitors. *J Chem Biol.* 1: 27-36.

Barrett EJ, DeFronzo RA, Bevilacqua S, Ferrannini E (1982). Insulin resistance in diabetic ketoacidosis. *Diabetes* 31: 923–928.

Bartoli ML, Novelli F, Costa F, Malagrino L, Melosini L, Bacci E, Cianchetti S, Dente FL, Di Franco A, Vagaggini B, Paggiaro PL (2011). Malondialdehyde in exhaled breath condensate as a marker of oxidative stress in different pulmonary diseases. *Mediators of inflammation* 891752.

Bas O, Songur A, Sahin O, Mollaoglu H, Ozen OA, Yaman M, Eser O, Fidan H, Yagmurca M (2006). The protective effect of fish n-3 fatty acids on cerebral ischemia in rat hippocampus. *Neuroch Inter.* 50: 548-554.

Baynes JW and Thorpe SR (1996). The role of oxidative stress in diabetic complications. *Current opinion in Endocrinology.* 3: 277-284.

Baskol G, Demir H, Baskol M, Kilic E, Ates F, Karakukcu C, Ustdal M (2006). Investigation of protein oxidation and lipid peroxidation in patients with rheumatoid arthritis. *Cell biochemistry and function* 24: 307-311.

Beckman KB and Ames BN (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews* 78: 547–581.

Beckman DA and Brent RL (1990). Teratogenesis: alcohol, angiotensin-converting-enzyme inhibitors, and cocaine. *Current opinion in obstetrics & gynecology* 2: 236-245.

Belfiore A, Frasca F, Pandini G, Sciacca L, Vigneri R (2009). Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocrine Reviews* 30: 586-623.

- Benedetti A, Comporti M, Esterbauer H (1980). Identification of 4-hydroxynonenal as a cytotoxic product originating from the peroxidation of liver microsomal lipids. *Biochimica et biophysica acta* 620: 281-296.
- Berr C, Balansard B, Arnaud J, Roussel AM, 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.
- Biessels GJ, Kappelle AC, Bravenboer B, Erkelens DW, Gispen WH (1994). "Cerebral function in diabetes mellitus," *Diabetologia* 37: 643–650.
- Biessels GJ, Ter Laak MP, Hamers FP, Gispen WH (2002). Neuronal Ca²⁺ dysregulation in diabetes mellitus. *Eur J Pharmacol.* 447: 201-209.
- Biessels GJ, van der Heide LP, Kamal A, Bleyls RL, Gispen WH (2002). Ageing and diabetes: implications for brain function. *Eur J Pharmacol* 441: 1-14.
- Biessels GJ, Staekenborg S, Brunner E, Brayne C, Scheltens P (2006). Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. *The Lancet Neurology* 5: 64-74.
- Bindokas VP, Jordan J, Lee CC, Miller RJ (1996). Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *J Neurosci* 16: 1324-1336.
- Blair IA (2008). DNA adducts with lipid peroxidation products. *The Journal of biological chemistry* 283: 15545-15549.
- Bondereff W (1964). Histophysiology of the aging nervous system. *Advances in Gerontological Research* 18: 1-22.
- Bonnefont-Rousselot D (2002). "Glucose and reactive oxygen species" .*Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 5: 561-568.
- Bourbon A, Vionnet M, Leprince P, Vaissier E, Copeland J, McDonagh P, Debre P, Gandjbakhch I (2004). The effect of methylprednisolone treatment on the cardiopulmonary bypass-induced systemic inflammatory response. *Eur J Cardiothorac Surg* 26: 932-938.
- Boya P, Ruggieri F, Codogno P (2013). Emerging regulation and functions of autophagy. *Nature cell biology* 15: 713-720.
- Boyd-Kimball D, Sultana R, Fai Poon H, Lynn BC, Pepeu G, Klein JB, Butterfield DA. (2005). Proteomic identification of proteins specifically oxidized by intracerebral injection of amyloid beta-peptide (1-42) into rat brain: Implications for Alzheimer's disease. *Neuroscience* 132: 313-324.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Brands AM, Biessels GJ, de Haan EH, Kappelle LJ, Kessels RP (2005). The effects of type 1 diabetes on cognitive performance: a meta-analysis. *Diabetes Care* 28: 726-735.

- Brands MW, Bell TD, Gibson B (2004). Nitric oxide may prevent hypertension early in diabetes by counteracting renal actions of superoxide. *Hypertension* 43: 57- 63.
- 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.
- Buttke TM and Sandstrom PA (1994). Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* 15: 7-10.
- Cardoso S, Santos RX, Correia SC et al., (2013). Insulin-induced recurrent hypoglycemia exacerbates diabetic brain mitochondrial dysfunction and oxidative imbalance. *Neurobiology of Disease* 49: 1–12.
- Casarejos MJ, Solano RM, Gómez A, Perucho J, de Yébenes JG (2011). The accumulation of neurotoxic proteins, induced by proteasome inhibition, is reverted by trehalose, an enhancer of autophagy, in human neuroblastoma cells. *Neurochem Int.* 58: 512-520.
- Ceriello A (2000). Oxidative Stress and Glycemic Regulation. *Metabolism* 49: 27-29.
- Ceriello A (2003). New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a "causal" antioxidant therapy. *Diabetes Care* 26: 1589-1596.
- Chappey O, Dosquet C, Wautier MP, Wautier JL (1997). Advanced glycation end products, oxidant stress and vascular lesions. *European Journal of Clinical Investigation.* 27: 97-108.
- Cheeseman KH, Beavis A, Esterbauer H (1988). Hydroxyl-radical-induced iron-catalysed degradation of 2-deoxyribose. Quantitative determination of malondialdehyde. *The Biochemical journal* 252: 649-653.
- Chen Y and Klionsky DJ (2011). The regulation of autophagy - unanswered questions. *J Cell Sci.* 124: 161-170.
- Cheng Z, Tseng Y, White MF (2010). Insulin signaling meets mitochondria in metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 21: 589–598.
- Cheng G, Huang C, Deng H, Wang H (2012). Diabetes as a risk factor for dementia and mild cognitive impairment: a metaanalysis of longitudinal studies, *Internal Medicine Journal* 42: 484-491.
- Cheong H, Nair U, Geng J, Klionsky DJ (2008). The Atg1 kinase complex is involved in the regulation of protein recruitment to initiate sequestering vesicle formation for nonspecific autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.* 19: 668-681.
- Chiang HL, Terlecky SR, Plant CP, Dice JF (1989). A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science* 246: 382-385.

- Chirico S (1994). High-performance liquid chromatography-based thiobarbituric acid tests. *Methods in enzymology* 233: 314-318.
- Cho HY, Reddy SP, Debiase A, Yamamoto M, Kleeberger SR (2005). Gene expression profiling of NRF2-mediated protection against oxidative injury. *Free Radic Biol Med.* 38: 325-343.
- Chucair AJ, Rotstein NP, SanGiovanni JP, During A, Chew EY, Politu LE (2007). Lutein and Zeaxanthin protect photoreceptors from apoptosis induced by oxidative stress: relationship with docosahexaenoic acid. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48: 5168-5177.
- Convit Wolf OT, Tarshish C, de Leon MJ (2003). Reduced glucose tolerance is associated with poor memory performance and hippocampal atrophy among normal elderly. *Proc Natl Acad Sci.* 100: 2019-2022.
- Convit A (2005). Links between cognitive impairment in insulin resistance: an explanatory model. *Neurobiol Aging* 26: 31-35.
- Craft S (2007). Insulin resistance and Alzheimer's disease pathogenesis: potential mechanisms and implications for treatment. *Curr Alzheimer Res.* 4: 147-152.
- Cuadrado A, Moreno-Murciano P, Pedraza-Chaverri J (2009). The transcription factor Nrf2 as a new therapeutic target in Parkinson's disease. *Exp Opin Therap Targets* 13: 319-329.
- Cuervo AM and Dice JF (2000). Regulation of lamp2a levels in the lysosomal membrane. *Traffic* 1: 570-583.
- Cuervo AM, Knecht E, Terlecky SR, Dice JF (1995). Activation of a selective pathway of lysosomal proteolysis in rat liver by prolonged starvation. *Am. J. Physiol.* 269: 1200-1208.
- Dalton TP, Chen Y, Schneider SN, Nebert DW, Shertzer HG (2004). Genetically altered mice to evaluate glutathione homeostasis in health and disease. *Free radical biology & medicine* 37: 1511-1526.
- Deary IJ, Crawford JR, Hepburn DA, Langan SJ, Blackmore LM, Frier BM (1993). Severe hypoglycemia and intelligence in adult patients with insulin-treated diabetes. *Diabetes* 42: 341-344.
- DeLeve LD and Kaplowitz N (1990). Importance and regulation of hepatic glutathione. *Seminars in liver disease* 10: 251-266.
- Dice J, Finn P, Majeski A, Mesieres N, Cuervo A (2003). Chaperone mediated autophagy. In: *Autophagy*, ed. D.J. Klionsky, Georgetown, TX: Landes Bioscience, 158-177.
- Ding Q, Dimayuga E, Keller JN (2007). Oxidative stress alters neuronal RNA- and protein-synthesis: implications for neural viability. *Free Radical Research* 41: 903-910.
- Donohue TM Jr (2009). Autophagy and ethanol-induced liver injury. *World Journal of Gastroenterology* 15: 1178-1185.

Duan WS, Zhang RY, Guo YS, Jiang YF, Huang YL, Jiang H, Li CY (2009). Nrf2 activity is lost in the spinal cord and its astrocytes of aged mice. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 45: 388–397.

Duarte AI, Moreira PI, Oliveira CR (2012). Insulin in central nervous system: more than just a peripheral hormone. *J Aging Res.* 384017.

Dugan LL, Sensi SL, Canzoniero LMT (1995). Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate. *The Journal of Neuroscience* 15: 6377–6388.

Ebrahimi-Fakhari D, Wahlster L, McLean PJ (2012). Protein degradation pathways in Parkinson's disease: curse or blessing. *Acta Neuropathologica* 124: 153-172.

El Naggari N and Kalra S (2016). Switching from Biphasic Human Insulin to Premix Insulin Analogs: A Review of the Evidence Regarding Quality of Life and Adherence to Medication in Type 2 Diabetes Mellitus. *Advances in Therapy* 33: 2091-2109.

Essick EE and Sam F (2010). Oxidative stress and autophagy in cardiac disease, neurological disorders, aging and cancer. *Oxid Med Cell Longev.* 3: 168-177.

Esteban I, Aguado C, Sanchez M, Knecht E (2007). Regulation of various proteolytic pathways by insulin and amino acids in human fibroblasts. *FEBS Lett* 581: 3415-3421.

Esterbauer H, Cheeseman KH, Dianzani MU, Poli G, Slater TF (1982). Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe²⁺ in rat liver microsomes. *The Biochemical Journal* 208: 129-140.

Esterbauer H, Lang J, Zdravcevic S, Slater TF (1984). Detection of malonaldehyde by high-performance liquid chromatography. *Methods in enzymology* 105: 319-328.

Esterbauer H, Benedetti A, Lang J, Fulcheri R, Fauler G, Comporti M (1986). Studies on the mechanism of formation of 4-hydroxynonenal during microsomal lipid peroxidation. *Biochimica et biophysica acta* 876: 154-166.

Esterbauer H and Cheeseman KH (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in enzymology* 186: 407-421.

Esterbauer H, Eckl P, Ortner A (1990). Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors. *Mutation research* 238: 223-233.

Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free radical biology & medicine* 11: 81-128.

Ezaki J, Matsumoto N, Takeda-Ezaki M, Komatsu M, Takahashi K (2011). Liver autophagy contributes to the maintenance of blood glucose and amino acid levels. *Autophagy* 7: 727-736.

Farahna M, Seke Etet PF, Osman S, Yurt K, Amir N, Vecchio L, Aydin I, Aldebasi Y, Sheikh A, Chijuka JC, Kaplan S, Adem A (2016). *Garcinia kola* aqueous suspension prevents cerebellar

- neurodegeneration in long-term diabetic rat a type 1 diabetes mellitus model. *Journal of Ethnopharmacology* 5: 0378-8741.
- Farooqui T (2008). Iron-induced oxidative stress modulates olfactory learning and memory in honeybees. *Behav Neuroscience* 122: 433-447.
- Fernandez-Checa JC, Kaplowitz N, Garcia-Ruiz C, Colell A, Miranda M, Mari M, Ardite E, Morales A (1997). GSH transport in mitochondria: defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol-induced defect. *The American journal of physiology* 273: 7-17.
- Fillebeen C and Pantopoulos K (2002). Redox control of iron regulatory proteins. *Redox Rep* 7: 15-22.
- Filomeni G, Rotilio G, Ciriolo MR (2005). Disulfide relays and phosphorylative cascades: Partners in redox-mediated signaling pathways. *Cell Death and Different* 12: 1555-1563.
- Finn PF and Dice JF (2005). Ketone bodies stimulate chaperone mediated autophagy. *Journal of Biological Chemistry* 280: 25864–25870.
- Fisher-Wellman KH and Neuffer PD (2012). Linking mitochondrial bioenergetics to insulin resistance via redox biology. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 23: 142-153.
- Francis GJ, Martinez JA, Liu WQ, Xu K, Ayer A, Fine J, Tuor UI, Glazner G, Hanson L R, Frey WH, Toth C (2008). Intranasal insulin prevents cognitive decline, cerebral atrophy and white matter changes in murine type I diabetic encephalopathy. *Brain* 131: 3311-3334.
- Fridovich I (1983). Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annual review of pharmacology and toxicology* 23: 239-257.
- Frolich L, Blum-Degen D, Bernstein HG, Engelsberger S, Humrich J, Laufer S, Muschner D, Thalheimer A, Turk A, Hoyer S, Zochling R, Boissl KW, Jellinger K, Riederer P (1998). Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 105: 423-438.
- Fukui K, Onodera K, Shinkai T, Suzuki S, 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.
- Fukui K, Omoi NO, Hayasaka T, Shinnkai T, Suzuki S, Abe K, 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: 275-284.
- Gallagher S, Winston SE, Fuller SA, Hurrell JG (2008) Immunoblotting and Immunodetection. In: *Current Protocols in Molecular Biology*. Chapter 8.
- Ganea E and Harding JJ (2006). Glutathione-related enzymes and the eye. *Current eye research* 31: 1-11.

- Garcia SC, Grotto D, Bulcao RP, Moro AM, Roehrs M, Valentini J, de Freitas FA, Paniz C, Bubols GB, Charao MF (2013). Evaluation of lipid damage related to pathological and physiological conditions. *Drug and chemical toxicology* 36: 306-312.
- Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC (2006). Mitochondrial glutathione: hepatocellular survival-death switch. *Journal of gastroenterology and hepatology* 21: 3-6.
- Gerozissis K (2003). Brain insulin: regulation, mechanisms of action and functions. *Cell Mol Neurobiology* 23: 1-25.
- Giacco F and Brownlee M (2010). Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res.* 107: 1058-1070.
- Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Offen D (2001). Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology* 40: 959-975.
- Gipp JJ, Chang C, Mulcahy RT (1992). Cloning and nucleotide sequence of a full-length cDNA for human liver gamma-glutamylcysteine synthetase. *Biochemical and biophysical research communications* 185: 29-35.
- Gipp JJ, Bailey HH, Mulcahy RT (1995). Cloning and sequencing of the cDNA for the light subunit of human liver gamma-glutamylcysteine synthetase and relative mRNA levels for heavy and light subunits in human normal tissues. *Biochemical and biophysical research communications* 206: 584-589.
- Giorgino F, Leonardini A, Laviola L (2013). Cardiovascular disease and glycemic control in type 2 diabetes: now that the dust is settling from large clinical trials. *Ann N Y Acad Sci.* 1281: 36-50.
- Gispén WH and Biessels GJ (2000). Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends Neuroscience* 23: 542-549.
- Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G (1996). Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes care* 19: 257-267.
- Gold AE, Deary IJ, Frier BM (1993). Recurrent severe hypoglycaemia and cognitive function in type 1 diabetes. *Diabetic Medicine* 10: 503-508.
- Gonzalez CD, Lee M, Marchetti P et al., (2011). The emerging role of autophagy in the pathophysiology of diabetes mellitus. *Autophagy* 7: 2-11.
- Grillo CA, Piroli GG, Hendry RM, Reagan LP (2009). Insulin-stimulated translocation of GLUT4 to the plasma membrane in rat hippocampus is PI3-kinase dependent. *Brain Res* 1296: 35-45.
- Grillo CA, Piroli GC, Rosell DR, Hoskin EK, McEwen BS, Reagan LP (2003). Region specific increases in oxidative stress and superoxide dismutase in the hippocampus of diabetic rats subjected to stress. *Neuroscience* 121: 133-140.

- Grotto D, Santa-Maria L, Valentini J, Paniz C, Schmitt G, Garcia SC, Juarez V, Batista J, Farina M (2009). Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for Malondialdehyde quantification. *Quim Nova* 32: 169-174.
- Gunn RM and Hailes HC (2008). Insights into the PI3-K-PKB-mTOR signalling pathway from small molecules. *J Chem Biol.* 1: 49-62.
- Gupta A, Tripathi AK, Tripathi RL, Madhu SV, Banerjee BD (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 LL, Diaz FG, O'Regan MH, Song D, Phillis JW (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.
- Haleng J, Pincemail J, Defraigne JO, Charlier C, Chapelle JP (2007). Oxidative stress. *Rev Med Liege.* 62: 628-38.
- Halliwell B and Gutteridge JM (1986). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* 246: 501-514.
- Hammes HP, Federoff HJ, Brownlee M (1995). Nerve growth factor prevents both neuroretinal programmed cell death and capillary pathology in experimental diabetes. *Mol Med* 1: 527-534.
- Han D, Yang B, Olson LK, Greenstein A, Baek SH (2010). Activation of autophagy through modulation of 5'-AMP-activated protein kinase protects pancreatic β -cells from high glucose. *Biochem J.* 425: 541-551.
- Hardy K and Hunt NH (2004). Effects of a redox-active agent on lymphocyte activation and early gene expression patterns. *Free Radic Biol Med.* 37: 1550-1563.
- Hariharan N, Maejima Y, Nakae J, Paik J, Depinho RA (2010). Deacetylation of FoxO by Sirt1 plays an essential role in mediating starvation-induced autophagy in cardiac myocytes. *Circ Res.* 107: 1470-1482.
- Hausladen A and Stamler JS (1999). Nitrosative stress. *Methods Enzymol.* 300: 389-395.
- Hermenegildo C, Raya A, Roma J, Romero FJ (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.
- Herrera DG, Yague AG, Johnsen-Soriano S, Bosch-Morell F, Collado-Morente L, Muriach M, Romero FJ, Garcia-Verdugo JM (2003). Selective impairment of hippocampal neurogenesis by chronic alcoholism: protective effects of an antioxidant. *Proc Natl Acad Sci.* 100: 7919-24.
- Hill BG, Haberkzettel P, Ahmed Y, Srivastava S, Bhatnagar A (2008). Unsaturated lipid peroxidation-derived aldehydes activate autophagy in vascular smooth-muscle cells. *Biochemical Journal* 410: 525-534.

- Hoffman WH, Andjelkovic AV, Zhang W, Passmore GG, Sima AAF (2010). Insulin and IGF-1 receptors, nitrotyrosin and cerebral neuronal deficits in two young patients with diabetic ketoacidosis and fatal brain edema. *Brain Research* 1343: 168–177.
- Hoffman WH, Siedlak SL, Wang Y, Castellani RJ, Smith MA (2011). Oxidative damage is present in the fatal brain edema of diabetic ketoacidosis. *Brain Research* 1369: 194-202.
- Hoffman WH, Shacka JJ, Andjelkovic AV (2012). Autophagy in the brains of young patients with poorly controlled T1DM and fatal diabetic ketoacidosis. *Experimental and Molecular Pathology* 93: 273-280.
- Hogg N (2002). The biochemistry and physiology of S-nitrosothiols. *Annual review of pharmacology and toxicology* 42: 585-600.
- Hohman TC, Banis D, Basso M, Cotter MA, Cameron NE (1997). Resistance to increased oxidative stress is decreased in experimental diabetic neuropathy. *J. Periph. Nerv. Syst.* 2: 272.
- 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 WM, Chen SS, Peng CH, Chen CF, Ko YC, Tsai DC, Chou CK, Ho LL, Chiou SH, Liu JH (2003). Elevated nitric oxide level in aqueous humor of AIDS patients with cytomegalovirus retinitis. *Ophthalmologica* 217: 298-301.
- Huang CS, Moore WR, Meister A (1988). On the active site thiol of gamma-glutamylcysteine synthetase: relationships to catalysis, inhibition, and regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85: 2464-2468.
- Huang CS, Anderson ME, Meister A (1993a). Amino acid sequence and function of the light subunit of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase. *The Journal of biological chemistry* 268: 20578-20583.
- Huang CS, Chang LS, Anderson ME, Meister A (1993b) Catalytic and regulatory properties of the heavy subunit of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase. *The Journal of biological chemistry* 268: 19675-19680.
- Hutter DE, Till BG, Greene JJ (1997). Redox state changes in density-dependent regulation of proliferation. *Experimental cell research* 232: 435-438.
- Ihara Y, Morishima-Kawashima M, Nixon R (2012). The ubiquitin-proteasome system and the autophagic-lysosomal system in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2: 006361.
- Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, 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.

- Jafari Anarkooli I, Barzegar Ganji H, Pourheidar M (2014). The Protective Effects of Insulin and Natural Honey against Hippocampal Cell Death in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Journal of Diabetes Research*. 2014: 491571.
- Jackson GR, Werrbach-Perez K, Pan Z, Sampath D, Perez-Polo J (1994). Neurotrophin regulation of energy homeostasis in the central nervous system. *Developmental Neuroscience* 16: 285–290.
- Jiménez S, Contreras F, Fouillioux C, Bolívar A, Ortiz H (2001). Intervención de Enfermería en el Cuidado del Paciente Diabético. *Revista de la Facultad de Medicina* 24: 33-41.
- Johnson PC, Brendel K, Meezan E (1982). Thickened cerebral cortical capillary basement membranes in diabetics. *Arch Pathol Lab Med*.106: 214-217.
- Junker U, Jaggi C, Bestetti G, Rossi GL (1985). Basement membrane of hypothalamus and cortex capillaries from normotensive and spontaneously hypertensive rats with streptozotocin-induced diabetes. *Acta Neuropathol*. 65: 202-208.
- Kabeya Y, Kamada Y, Baba M, Takikawa H, Sasaki M, Ohsumi Y (2005a). Atg17 functions in cooperation with Atg1 and Atg13 in yeast autophagy. *Mol Biol Cell*. 16: 2544-53.
- Kabeya Y, Kamada Y, Baba M, Takikawa H, Sasaki M, Ohsumi Y (2005b). Atg17 functions in cooperation with Atg1 and Atg13 in yeast autophagy. *Mol Biol Cell*. 16: 2544-2553.
- Kahraman S, Aydin C, Elpek GO, Dirice E, Sanlioglu AD (2015). Diabetes-Resistant NOR Mice Are More Severely Affected by Streptozotocin Compared to the Diabetes-Prone NOD Mice: Correlations with Liver and Kidney GLUT2 expressions. *Journal of Diabetes Research* 450128.
- Kaneto H, Nakatani Y, Miyatsuka T, Kawamori D, Matsuoka TA (2004). Possible novel therapy for diabetes with cell-permeable JNK-inhibitory peptide. *Nat Med*. 10: 1128-1132.
- Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D (2011). The Beclin1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ* 18: 571-580.
- Kanki T, Klionsky DJ, Okamoto K (2011). Mitochondria autophagy in yeast. *Antioxid Redox Signal* 14: 1989-2001.
- Kaplan MS and Bell DH (1984). Mitotic neuroblasts in the 9-day-old and 11month-old rodent hippocampus. *J Neurosci* 4: 1429-1441.
- Kaplowitz N, Aw TY, Ookhtens M (1985). The regulation of hepatic glutathione. *Annual review of pharmacology and toxicology* 25: 715-744.
- Kas J and Blattna J (1986). Phospholipids in foodstuffs. *Acta Universitatis Carolinae Medica* 32: 81-92.
- Kaushik S, Massey AC, Mizushima N, Cuervo AM (2008). Constitutive Activation of Chaperone-mediated Autophagy in Cells with Impaired Macroautophagy. Subramani S, ed. *Molecular Biology of the Cell*. 19: 2179-2192.

- Kellogg AP, Wiggin TD, Larkin DD, Hayes JM, Stevens MJ, Pop-Busui R (2007). Protective effects of cyclooxygenase-2 gene inactivation against peripheral nerve dysfunction and intraepidermal nerve fiber loss in experimental diabetes. *Diabetes* 56: 2997-3005.
- Kiffin R, Christian C, Knecht E, Cuervo AM (2004). Activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress. *Mol Biol Cell* 15: 4829-4840.
- Kilpatrick ES, Rigby AS, Atkin SL (2006). The effect of glucose variability on the risk of microvascular complications in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 29: 1486-1490.
- Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol.* 13: 132-141.
- Kimura S, Noda T, Yoshimori T (2008). Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes. *Cell Struct Funct* 33: 109-122.
- Kim J, Rushovich EH, Thomas TP, Ueda T, Agranoff BW, Greene DA (1991). Diminished specific activity of cytosolic protein kinase C in sciatic nerve of streptozotocin-induced diabetic rats and its correction by dietary myo-inositol. *Diabetes* 40: 1545-1554.
- Kim DS, Jeong SK, Kim HR, Chae SW, Chae HJ (2007). Effects of triglyceride on ER stress and insulin resistance. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 363: 140-145.
- Klann E (1998). Cell-permeable scavengers of superoxide prevent long-term potentiation in hippocampal area CA1. *J Neurophysiol.* 80: 452-457.
- Klatt P and Lamas S (2000). Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur J Biochem.* 267: 4928-4944.
- Klein JP and Waxman SG (2003). The brain in diabetes: molecular changes in neurons and their implications for end-organ damage. *Lancet Neurol.* 2: 548-554.
- Klionsky DJ (2007). Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8: 931-7.
- Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, Agrawal DK, Aliev G (2008). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* 4: 151-175.
- Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A (2012). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8: 445-544.
- Knecht E, Aguado C, Carcel J, Esteban I, Esteve JM, et al. (2009). Intracellular protein degradation in mammalian cells: recent developments. *Cell Mol Life Sci.* 66: 2427-2443.
- Kodl CT and Seaquist ER (2008). Cognitive dysfunction and diabetes mellitus. *Endocr Rev.* 29: 494-511.
- Kobayashi S, Xu X, Chen K, Liang Q (2012). Suppression of autophagy is protective in high glucose-induced cardiomyocyte injury. *Autophagy* 8: 577-592.

- Koga H and Cuervo AM (2011). Chaperone-mediated autophagy dysfunction in the pathogenesis of neurodegeneration. *Neurobiol Dis.* 43: 29-37.
- Kowluru RA, Koppolu P, Chakrabarti S, 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 RA (2003). Effect of reinstatement of good metabolic control on retinal oxidative stress and nitrate stress in diabetic rats. *Diabetes* 52: 818-823.
- Kowluru RA and Odenbach S (2004). Role of Interleukin-1beta in the development of retinopathy in rats: effect of antioxidants. *IOVS* 45: 4161-4166.
- Kramer L, Fasching P, Madl C, Schneider B, Damjancic P, Waldhausl W, Irsigler K, 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.
- 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, Bishnoi M, Tiwari V, Chopra K (2009). Suppression of NF-kappaB signaling pathway by tocotrienol can prevent diabetes associated cognitive deficits. *Pharmacol Biochem Behav.* 92: 251-259.
- Kumagai AK (1999). Glucose transport in brain and retina: implications in the management and complications of diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 15: 261-273.
- Kwak MK, Wakabayashi N, Itoh K, Motohashi H, Yamamoto M, Kensler TW (2003). Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 pathway—identification of novel gene clusters for cell survival. *J Biol Chem.* 278: 8135-8145.
- Lawrence RA, Parkhill LK, Burk RF (1978). Hepatic cytosolic non selenium - dependent glutathione peroxidase activity: its nature and the effect of selenium deficiency. *J Nutr.* 108: 981 - 987.
- Lee SB, Kim S, Lee J, Park J, Lee G, Kim Y, Kim JM, Chung J (2007). ATG1, an autophagy regulator, inhibits cell growth by negatively regulating S6 kinase. *EMBO Rep.* 8: 360- 365.
- Leibowitz G, Levin F (1999). Gene therapy for type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Reviews* 7: 124-138.
- Levine B and Kroemer G (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell.* 132: 27-42.
- Li ZG, Qiang X, Sima AA, 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 ZG, Zhang W, Grunberger G, Sima AA (2002). Hippocampal neuronal apoptosis in type 1 diabetes. *Brain Res.* 946: 221-231.
- Li ZG, Zhang W, Sima AA (2007). Alzheimer-like changes in rat models of spontaneous diabetes. *Diabetes* 56: 1817-1824.
- Li G, Chen Y, Hu H, Liu L, Hu X, Wang J, Shi W, Yin D (2012). Association between age-related decline of kidney function and plasma malondialdehyde. *Rejuvenation research* 15: 257-264.
- Liu Y, Song XD, Liu W, Zhang TY, Zuo J (2003). Glucose deprivation induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in PC12 cell line. *J Cell Mol Med* 7: 49-56.
- Liu M, Spellberg B, Phan QT (2010). The endothelial cell receptor GRP78 is required for mucormycosis pathogenesis in diabetic mice. *Journal of Clinical Investigation* 120: 1914-1924.
- Lorente de No´ R (1933). Studies on the structure of the cerebral cortex. I. The area entorhinalis. *J Psychol Neurol.* 45: 381–438.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.*193: 265-275.
- Lu SC (1999). Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 13: 1169-1183.
- Lu SC (2009). Regulation of glutathione synthesis. *Molecular aspects of medicine* 30: 42-59.
- Luczaj W and Skrzydlewska E (2003). DNA damage caused by lipid peroxidation products. *Cellular & molecular biology letters* 8: 391-413.
- Ma LY, Zhang DM, Tang Y, Lu Y, Zhang Y, Gao Y, Xia L, Zhao KX, Chai LY, Xiao Q (2011). Ghrelin-attenuated cognitive dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 25: 352-363.
- Ma LY, Lv YL, Huo K, Liu J, Shang SH, Fei YL, Li YB, Zhao BY, Wei M, Deng YN, Qu QM (2016). Autophagy-lysosome dysfunction is involved in A β deposition in STZ-induced diabetic rats. *Behav Brain Res.*16 :30887-7
- Majeski AE and Dice JF (2004). Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol.* 12: 2435-2444.
- Mankovsky BN, Metzger BE, Molitch ME, Biller J (1996). Cerebrovascular disorders in patients with diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* 10: 228-242.
- Marambio P, Toro B, Sanhueza C, Troncoso R, Parra V (2010). Glucose deprivation causes oxidative stress and stimulates aggresome formation and autophagy in cultured cardiac myocytes. *Biochim Biophys Acta* 1802: 509-518.

- Martinez-Vicente M, Sovak G, Cuervo AM (2005). Protein degradation and aging. *Experimental Gerontology* 40: 622–633.
- Maruyama R, Goto K, Takemura G, Ono K, Nagao K, (2008). Morphological and biochemical characterization of basal and starvation-induced autophagy in isolated adult rat cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 295: 1599-1607.
- Massey AC, Zhang C, Cuervo AM (2006). Chaperone-mediated autophagy in aging and disease. *Curr Top Dev Biol.* 73: 205-235.
- Mastrocola R, Restivo F, Vercellinato I, Danni O, Brignardello E, Aragno M, Boccuzzi G (2005). Oxidative and nitrosative stress in brain mitochondria of diabetic rats. *J. Endocrinol.* 187: 37-44.
- Mata-Cases M, Franch-Nadal J, Real J (2016). Glycaemic control and antidiabetic treatment trends in primary care centres in patients with type 2 diabetes mellitus during 2007-2013 in Catalonia: a population-based study. e012463.
- Matough FA, Budin SB, Hamid ZA, Alwahaibi N and Mohamed J (2012). The role of oxidative stress and antioxidants in diabetic complications. *Sultan Qaboos Univ Med J.* 12: 5-18.
- Matsunaga K, Saitoh T, Tabata K, Omori H, Satoh T (2009). Two Beclin1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nat Cell Biol* 11: 385-396.
- McCrimmon RJ, Ryan CM, Frier BM (2012). Diabetes and cognitive dysfunction. *Lancet* 379: 2291-2299.
- McCrimmon RJ and Sherwin RS (2010). Hypoglycemia in type 1 diabetes. *Diabetes* 59: 2333-2339.
- McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, Chanas SA, Henderson CJ, McLellan LI, Wolf CR, Cavin C, Hayes JD (2001). The cap 'n' collar basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (NF-E2 p45-related factor 2) controls both constitutive and inducible expression of intestinal detoxification and glutathione biosynthetic enzymes. *Cancer Res.* 61: 3299-3307.
- McNay EC and Recknagel AK (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.
- Meister A and Anderson ME (1983). Glutathione. *Annual review of biochemistry* 52: 711-760.
- Merendino RA, Salvo F, Saija A, Di Pasquale G, Tomaino A, Minciullo PL, Fraccica G, Gangemi S (2003). Malondialdehyde in benign prostate hypertrophy: a useful marker? *Mediators of inflammation* 12: 127-128.

- Mijnhout GS, Scheltens P, Diamant M, Biessels GJ, Wessels AM, Simsek S, Snoek F J, Heine RJ (2006). Diabetic encephalopathy: a concept in need of a definition. *Diabetologia* 49: 1447-1448.
- Miles WR and Root HF (1922). "Root HF Psychologic tests applied in diabetic patients". *Archives of Internal Medicine* 30: 767–770.
- Millan M, Levy I, Casamitjana R, Bergua M, Halperin I, Gil-Vernet JM, Fernández-Cruz L, Figuerola D (1984). Early carbohydrate metabolism after pancreas transplantation. *Diabetes Care* 7: 405-407.
- Miranda M, Muriach M, Almansa I, Arnal E, Messeguer A, Díaz-Llopis M, Romero FJ, Bosch-Morell F (2007). CR-6 protects glutathione peroxidase activity in experimental diabetes. *Free Radic Biol Med.* 43: 1494-1498.
- Miranda M, Muriach M, Roma J, Bosch-Morell F, Genoves JM, Barcia J, Araiz J, Diaz-Llospis M, Romero FJ (2006). Oxidative stress in a model of experimental diabetic retinopathy: the utility of peroxynitrite scavengers. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 81: 27-32.
- Mizushima N, Klionsky DJ (2007). Protein turn over via autophagy: implications for metabolism. *Annu Rev Nutr.* 27: 19-40.
- Moreira PI, Cardoso SM, Pereira CM, Santos MS, Oliveira CR (2009). Mitochondria as a therapeutic target in Alzheimer's disease and diabetes. *CNS and Neurological Disorders-DrugTargets* 8: 492–511.
- Muller C, Salvayre R, N'egre-Salvayre A, Vindis C (2011). HDLs inhibit endoplasmic reticulum stress and autophagic response induced by oxidized LDLs. *Cell Death and Differentiation* 18: 817-828.
- Muriach M, Bosch-Morell F, Alexander G, Blomhoff R, Barcia J, Arnal E, Almansa I, Romero FJ, Miranda M (2006). Lutein effect on retina and hippocampus of diabetic mice. *Free Radic Biol Med.* 41: 979-984.
- Nakatani Y, Kaneto H, Kawamori D, Yoshiuchi K, Hatazaki M (2005). Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes. *J Biol Chem.* 280: 847-851.
- Nathan DM (2014). Hypoglycemia in the diabetes control and complications trial. *Diabetes Care* 37: 9-16.
- Negi G, Kumar A, Sharma SS (2011). Melatonin modulates neuroinflammation and oxidative stress in experimental diabetic neuropathy: effects on NF-kappaB and Nrf2 cascades. *J Pineal Res.* 50: 124-131.
- Niedernhofer LJ, Daniels JS, Rouzer CA, Greene RE, Marnett LJ (2003). Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *The Journal of biological chemistry* 278: 31426-31433.

- Obrosova IG, Fathallah L, Greene DA (2000). Early changes in lipid peroxidation and antioxidative defense in diabetic rat retina: effect of DL-lipoic acid. *Eur. J. Pharmacol.* 398: 139-46.
- Ogunyinka BI, Oyinloye BE, Osunsanmi FO, Opoku AR, Kappo AP (2016). Modulatory influence of *Parkia biglobosa* protein isolate on testosterone and biomarkers of oxidative stress in brain and testes of streptozotocin-induced diabetic male rats. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology* 8: 78-86.
- Oja SS, Janaky R, Varga V, Saransaari P (2000) Modulation of glutamate receptor functions by glutathione. *Neurochemistry international* 37: 299-306.
- Oppenheimer L, Wellner VP, Griffith OW, Meister A (1979). Glutathione synthetase. Purification from rat kidney and mapping of the substrate binding sites. *The Journal of biological chemistry* 254: 5184-5190.
- Packer L, Rösen P, Tritschler HJ, King GL, Azzi A (2000). *Antioxidants in Diabetes Management*. New York: Marcel Dekker.
- Packer L, Kraemer K, Rimbach G (2001). Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetic complications. *Nutrition* 17: 888-95.
- 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 TM, Touyz RM (2008). NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care* 31: 170-180.
- Patel M (2004). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: cause and consequence of epileptic seizures. *Free Radic Biol Med* 37: 1951-1962.
- Pelligrino DA, Miletich DJ, Albrecht RF (1992). Diminished muscarinic receptor-mediated cerebral blood flow response in streptozotocin-treated rats. *Am J Physiol.* 262: 447-454.
- Peterson G (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem.* 83: 346-356.
- Poli G, Dianzani MU, Cheeseman KH, Slater TF, Lang J, Esterbauer H (1985). Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by carbon tetrachloride or ADP-iron in isolated rat hepatocytes and rat liver microsomal suspensions. *The Biochemical journal* 227: 629-638.
- Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, De Tata V, Casini AF (2003). The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochemical pharmacology* 66: 1499-1503.

- Prabhakar O (2013). Cerebroprotective effect of resveratrol through antioxidant and anti-inflammatory effects in diabetic rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 386: 705.
- Pryor WA (1989). On the detection of lipid hydroperoxides in biological samples. *Free radical biology and medicine* 7: 177-178.
- Rahman T, Hosen I, Towhidul Islam MM, Shekhar HU (2012) Oxidative stress and human health. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 3: 997-1019.
- Ramachandran S, Croft P, Neary RH (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.
- Ravikumar B, Stewart A, Kita H, Kato K, Duden R (2003). Raised intracellular glucose concentrations reduce aggregation and cell death caused by mutant huntingtin exon 1 by decreasing mTOR phosphorylation and inducing autophagy. *Hum Mol Genet.* 12: 985-994.
- Reed DJ, Babson JR, Beatty PW, Brodie AE, Ellis WW, Potter DW (1980). High-performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols and disulfides. *Anal Biochem.* 106: 55-62.
- Reagan LP, Magariños AP, Yee DK et al., (2000). Oxidative stress and HNE conjugation of GLUT3 are increased in the hippocampus of diabetic rats subjected to stress. *Brain Research* 862: 292-300.
- Reagan LP (2002). Glucose, stress, and hippocampal neuronal vulnerability. *Int Rev Neurobiol.* 51: 289-324.
- Reagan LP (2005). Neuronal insulin signal transduction mechanisms in diabetes phenotypes. *Neurobiol Aging* 26: 56-59.
- Ribak CE, Seress L, Amaral DG (1985). The development, ultrastructure and synaptic connections of the mossy cells of the dentate gyrus. *J Neurocytol.* 14: 835-857.
- Richard MJ, Guiraud P, Meo J, 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.
- Richman PG, Meister A (1975). Regulation of gamma-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *The Journal of biological chemistry* 250: 1422-1426.
- Rodríguez-Muela N, Koga H, García-Ledo L, de la Villa P, de la Rosa EJ, Cuervo AM, Boya P (2013). Balance between autophagic pathways preserves retinal homeostasis. *Aging Cell.* 12: 478-488.

- Rodríguez-Navarro JA, Rodríguez L, Casarejos MJ, Solano RM, Gómez A (2010). Trehalose ameliorates dopaminergic and tau pathology in parkin deleted/tau overexpressing mice through autophagy activation. *Neurobiol Dis.* 39: 423-438.
- Romero FJ, Bosch-Morell F, Romero MJ, Jareno EJ, Romero B, Marin N, Roma J (1998). Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. *Environmental health perspectives* 106 :1229-1234.
- Sadeghi A, Hami J, Razavi S, Esfandiary E, Hejazi Z (2016). The Effect of Diabetes Mellitus on Apoptosis in Hippocampus: Cellular and Molecular Aspects. *International Journal of Preventive Medicine.* 7: 57.
- Sanyal J, Bandyopadhyay SK, Banerjee TK, Mukherjee SC, Chakraborty DP, Ray BC, Rao VR (2009). Plasma levels of lipid peroxides in patients with Parkinson's disease. *European review for medical and pharmacological sciences* 13: 129-132.
- Sarkar S, Davies JE, Huang Z, Tunnacliffe A, Rubinsztein DC (2007). Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and α -synuclein. *J Biol Chem.* 282: 5641-5652.
- Satriano JA, Shuldiner M, Hora K, Xing Y, Shan Z, 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- α and immunoglobulin G. Evidence for involvement of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-dependent oxidase. *J Clin Invest.* 92: 1564-1571.
- Sautin YY, Lu M, Gaugler A, Zhang L, Gluck SL (2005). Phosphatidylinositol 3-kinase-mediated effects of glucose on vacuolar H⁺-ATPase assembly, translocation, and acidification of intracellular compartments in renal epithelial cells. *Mol Cell Biol.* 25: 575-589.
- Schmeichel AM, Schmelzer JD, Low PA (2003). Oxidative injury and apoptosis of dorsal root ganglion neurons in chronic experimental diabetic neuropathy. *Diabetes* 52: 165-171.
- Schworer CM and Mortimore GE (1979). Glucagon induced autophagy and proteolysis in rat liver: mediation by selective deprivation of intracellular amino acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76: 3169-3173.
- Seelig GF, Simonsen RP, Meister A (1984). Reversible dissociation of gamma-glutamylcysteine synthetase into two subunits. *The Journal of biological chemistry* 259: 9345-9347.
- Selvin E, Steffes MW, Zhu H, et al. (2010). Glycated Hemoglobin, Diabetes, and Cardiovascular Risk in Nondiabetic Adults. *The New England journal of medicine.* 362: 800-811.
- Seri B, Garcia-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A (2001). Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci.* 21: 7153-7160.

- Shafir E (1997). Diabetes in animals: contribution to the understanding of diabetes by study of its etiopathology in animal models. *Ellenberg and Rifkin's Diabetes Mellitus; Theory and Practice* 301- 348.
- Shibata N, Kobayashi M (2008). The role for oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Brain Nerve* 60 : 157-70.
- Sies H (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp physiol.* 82: 291-5.
- Silva AL, Amaral AR, Oliveira DS, Martins L, Silva MR, Silva JC (2016). Neonatal outcomes according to different therapies for gestational diabetes mellitus. *J Pediatr (Rio J)*.
- Sima AA, Kamiya H, Li ZG (2004). Insulin, C-peptide, hyperglycemia, and central nervous system complications in diabetes. *Eur J Pharmacol.* 494: 77
- Sima AA (2010). Encephalopathies: the emerging diabetic complications. *Acta Diabetol* 47: 279-293.
- Sindhu RK, Ehdaie A, Farmand F, Dhaliwal KK, Nguyen T, Zhan CD, Roberts CK, Vaziri ND (2005). Expression of catalase and glutathione peroxidase in renal insufficiency. *Biochim Biophys Acta* 1743: 86-92.
- Singh R, Kaushik S, Wang Y (2009). Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 458: 1131-1135.
- Singh R and Cuervo AM (2011). Autophagy in the cellular energetic balance. *Cell Metab.* 13: 495-504.
- Sinha N, Taha A, Baquer NZ, Sharma D (2008). Exogenous administration of dehydroepiandrosterone attenuates loss of superoxide dismutase activity in the brain of old rats. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* 45: 57-60.
- Starr VL, Convit A (2007). Diabetes, sugar-coated but harmful to the brain. *Curr Opin Pharmacol.* 7: 638-642.
- Stiles BL (2009). PI-3-K and AKT: onto the mitochondria. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61: 1276-1282.
- Suresh Kumar JS, Menon VP (1993). Effect of diabetes on levels of lipid peroxides and glycolipids in rat brain. *Metabolism* 42: 1435-1439.
- Suthanthiran M, Anderson ME, Sharma VK, Meister A (1990). Glutathione regulates activation-dependent DNA synthesis in highly purified normal human T lymphocytes stimulated via the CD2 and CD3 antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87: 3343-3347.
- Suzuki K, Kirisako T, Kamada Y, Mizushima N, Noda T, Ohsumi Y (2001). The preautophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J.* 20: 5971-81.

- Svensk AM, Soini Y, Paakko P, Hiravikoski P, Kinnula VL (2004). Differential expression of superoxide dismutases in lung cancer. *Am J Clin Pathol.* 122: 395-404.
- Taherbhoy AM, Tait SW, Kaiser SE, Williams AH, Deng A (2011). Atg8 transfer from Atg7 to Atg3: a distinctive E1-E2 architecture and mechanism in the autophagy pathway 44: 451-461.
- Takahashi Y, Coppola D, Matsushita N, Cualing HD, Sun M (2007). Bif-1 interacts with Beclin1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat Cell Biol.* 9: 1142-1151.
- Tangvarasittichai S (2015). Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes* 6: 456-480.
- Telfer JF, Brock JH (2004). Proinflammatory cytokines increase iron uptake into human monocytes and synovial fibroblasts from patients with rheumatoid arthritis. *Med Sci Monit.* 10: 91-95.
- Tesfamariam B, Brown ML, Cohen RA (1991). Elevated glucose impairs endothelium-dependent relaxation by activating protein kinase C. *J Clin Invest.* 87: 1643-1648.
- Todde V, Veenhuis M, van der Klei IJ (2009). Autophagy: principles and significance in health and disease. *Biochim Biophys Acta.* 1792: 3-13.
- Torchinsky A, Toder V (2007). TNFalpha in the pathogenesis of diabetes-induced embryopathies: functions and targets. *Rev Diabet Stud.* 4: 200-209.
- Touyz RM (2004). Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension* 44: 248-252.
- Townsend DM, Tew KD, Tapiero H (2003). The importance of glutathione in human disease. *Biomedecine & pharmacotherapy* 57: 145-155.
- Trush MA, Mimnaugh EG, Gram TE (1982). Activation of pharmacologic agents to radical intermediates. Implications for the role of free radicals in drug action and toxicity. *Biochemical pharmacology* 31: 3335-3346.
- Ulusu NN, Sahilli M, Avciatal A (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. *Neurochemical Research* 28: 815-823.
- Vaccaro MI, Ropolo A, Grasso D, Iovanna JL (2008). A novel mammalian trans-membrane protein reveals an alternative initiation pathway for autophagy. *Autophagy* 4: 388-390.
- VanderVeen LA, Hashim MF, Shyr Y, Marnett LJ (2003). Induction of frameshift and base pair substitution mutations by the major DNA adduct of the endogenous carcinogen malondialdehyde. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 14247-14252.

- Vanhanen M, Koivisto K, Karjalainen L, Helkala EL, Laakso M, Soininen H, Riekkinen P (1997). Risk for non-insulin-dependent diabetes in the normoglycaemic elderly is associated with impaired cognitive function. *Neuroreport* 8: 1527-1530.
- Wagner RT, Lewis J, Cooney A, Chan L (2010). Stem cell approaches for the treatment of type 1 diabetes mellitus. *Transl Res.* 156: 169-179.
- Wang Q, Liang B, Shirwany NA, Zou MH (2011). 2-Deoxy-D-glucose treatment of endothelial cells induces autophagy by reactive oxygen species-mediated activation of the AMP-activated protein kinase. *PLoS One* 6: e17234.
- Wessels AM, Rombouts SA, Remijnse PL et al., (2007). Cognitive performance in type 1 diabetes patients is associated with cerebral white matter volume. *Diabetologia* 50: 1763-1769.
- Whitten KW, Gailey KD (1985). *Química general* (1ª ed). México DF: Nueva editorial Interamericana.
- Williams SB, Goldfine AB, Timimi FK, Ting HH, Roddy MA, Simonson DC, Creager MA (1998). Acute hyperglycemia attenuates endothelium-dependent vasodilation in humans in vivo. *Circulation* 97: 1695-1701.
- Williams T, Forsberg LJ, Viollet B, Brenman JE (2009). Basal autophagy induction without AMP-activated protein kinase under low glucose conditions. *Autophagy* 5: 1155-1165.
- Wolf SP (1993). Diabetes mellitus and free radicals. Free radicals, transition metals and oxidative stress in the aetiology of diabetes mellitus and complications. *Br Med Bull* 49: 642-52.
- Xi H, Kurtoglu M, Liu H, Wangpaichitr M, You M (2011). 2-Deoxy-D-glucose activates autophagy via endoplasmic reticulum stress rather than ATP depletion. *Cancer Chemother Pharmacol.* 67: 899-910.
- Xu Q, Li X, Kotecha SA, Cheng C, Sun CH, Zochodne DW (2004). Insulin as an in vivo growth factor. *Experimental Neurology* 188: 43-51.
- Yan N, Meister A (1990). Amino acid sequence of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase. *The Journal of biological chemistry* 265: 1588-1593.
- Yang Y, Dieter MZ, Chen Y, Shertzer HG, Nebert DW, Dalton TP (2002). Initial characterization of the glutamate-cysteine ligase modifier subunit Gclm(-/-) knockout mouse. Novel model system for a severely compromised oxidative stress response. *The Journal of biological chemistry* 277: 49446-49452.
- Yonguc GN, Dodurga Y, Adiquzel E, Gondogdu G, Kucukatay V, Ozbal S, Yilmaz I, Caukurt U, Yilmaz Y Akdogan I (2015). Grape seed extract has superior beneficial effects than vitamin E on oxidative stress and apoptosis in the hippocampus of streptozotocin induced diabetic rats. *Gene* 555: 119-26.

Yorimitsu T, Klionsky DJ (2005). Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ.* 12: 1542-52.

Younce CW and Kolattukudy PE (2010). MCP-1 causes cardiomyoblast death via autophagy resulting from ER stress caused by oxidative stress generated by inducing a novel zinc-finger protein, MCPIP. *Biochem J.* 426: 43-53.

Yu T, Robotham JL, Yoon Y (2006). Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 2653-2658.

Yuan J and Yankner BA (2000). Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407: 802-809.

Zarkovic N, Cipak A, Jaganjac M, Borovic S, Zarkovic K (2013). Pathophysiological relevance of aldehydic protein modifications. *Journal of proteomics* 92: 239-247.

Zhang BB, Moller DE. (2000). New approaches in the treatment of type 2 diabetes. *Curr Opin Chem Biol.* 4: 461-467.

Zhao W, Chen H, Xu H, Moore E, Meiri N, Quon MJ, Alkon DL (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.

Zimmerman MC, Lazartigues E, Lang JA, Sinnayah P, Ahmad IM, Spitz DR, Davisson RL (2002). Superoxide mediates the actions of angiotensin II in the central nervous system. *Circ Res.* 91: 1038-1045.