

Universidade da Beira Interior

Caracterização de parâmetros neurotóxicos e sinalização da insulina em hipocampo de um modelo animal de diabetes tipo 2

Andreia Alexandra Machado Melo

Covilhã, Junho 2010

Caracterização de parâmetros neurotóxicos e sinalização da insulina em hipocampo de um modelo animal de diabetes tipo 2

Dissertação apresentada à Universidade da Beira
Interior para obtenção do grau de Mestre em
Bioquímica

Andreia Alexandra Machado Melo

Orientador: Prof. Dr. Frederico Pereira (IBILI, Universidade de Coimbra)

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Petronila Rocha Pereira (Universidade da Beira Interior)

*À Memória dos
meus avós*

Índice

Agradecimentos	II
Resumo	III
Abstract	IV
Índice de Figuras	V
Índice de Gráficos e tabelas	VI
Abreviaturas	VII
1. Introdução	1
1.1. Diabetes	2
1.1.1. Prevalência	3
1.1.2. Diabetes e sistema nervoso central	4
1.2. Mecanismos de neutotoxicidade da glucose	4
1.2.1. Via do poliol e stress oxidativo	4
1.2.2. Produtos finais de glicação avançada	5
1.2.3. Receptor dos produtos finais de glicação avançada	7
1.3. Apoptose	9
1.4. Células da glia	11
1.4.1. Astrócitos	11
1.4.2. Proteína Ácida Fribiliar Glial	12
1.5. Proteína de 25 kDa associada a sinaptossoma e syntaxina	13
1.6. Insulina e SNC	13
1.6.1. Receptores de insulina e ligandos	14
1.7. Modelos animais na <i>diabetes mellitus</i> tipo 2	15
1.7.1. Ratos Zucker Diabetic Fatty	16
2. Objectivos	17
2.1. Objectivo geral	18
2.2. Objectivos específicos	18
3. Materiais e métodos	19
3.1. Animais	20
3.2. Grupos de estudo	20
3.3. Determinação do peso corporal	21
3.4. Avaliação da variação dos níveis de glicemia	21
3.5. Sacrifício do animais, colheita de sangue e região cerebral	21

3.6.	Avaliação dos parâmetros bioquímicos	22
3.6.1.	Glucose	22
3.6.2.	Insulina	22
3.6.3.	HOMA-IR	23
3.6.4.	Hemoglobina glicosilada	23
3.7.	Preparação de extractos totais	24
3.8.	Electroforese em gel de poli-acrilamida e Imunodeteção	24
3.9.	Análise estatística	26
4.	Resultados	27
4.1.	Peso corporal	28
4.2.	Glicemia	28
4.3.	Hemoglobina glicosilada	29
4.4.	Insulina	30
4.5.	Resistência à insulina – HOMA-IR	31
4.6.	Expressão da proteína GFAP	32
4.7.	Expressão da proteína RAGE	33
4.8.	Expressão das proteínas Bax e Bcl-2	33
4.9.	Expressão das proteínas syntaxina e SNAP-25	35
4.10.	Expressão de IR β	36
4.11.	Expressão da proteína IRS-1	36
4.11.1.	Expressão da proteína IRS-1 fosforilada na tirosina 612	37
4.11.2.	Razão (IRS-1 pY ⁶¹²)/IRS-1	37
5.	Discussão	38
6.	Conclusão	44
7.	Bibliografia	46

Agradecimentos

Agradeço ao Director do Instituto de Farmacologia e Terapêutica Experimental da Faculdade de Medicina de Coimbra, Professor Frederico Teixeira.

Agradeço, à Professora Doutora Petronila Rocha-Pereira, por todos os ensinamentos e amizade.

Ao meu orientador, Professor Doutor Frederico Pereira, um muito obrigado, pelo empenho e dedicação ao longo de todo o trabalho.

Obrigada, ao Professor Doutor Flávio Reis, por toda a dedicação e forma como me recebeu.

Agradeço à Professora Doutora Ana Paula, à Professora Doutora Rosa Duarte, à Professora Doutora Eugenia Carvalho.

Muito obrigada à Joana Gonçalves e à Sofia Baptista, por todos os ensinamentos e disponibilidade, sem as quais não teria sido possível a realização deste trabalho.

À Joana e Filipa, do grupo de oftalmologia, pela disponibilidade e contribuição para este trabalho.

Agradeço, à Andreia Gonçalves, Raquel Cerejo, Margarida Teixeira e Sara Nunes, pelo companheirismo e amizade.

Um agradecimento muito especial aos meus pais e à minha irmã, por todo o apoio ao longo da vida.

Ao meu grande amigo Miguel Rodrigues, agradeço por toda a dedicação e amizade, para as quais não tenho palavras.

Resumo

A *diabetes mellitus* aumenta o risco para distúrbios no sistema nervoso central, tais como acidentes vasculares isquêmicos, demência e declínio cognitivo. O hipocampo que desempenha um papel fundamental nos processos de aprendizagem e memória, apresenta maior susceptibilidade nestas patologias. O objectivo deste trabalho foi caracterizar, pela primeira vez, o modelo animal de *diabetes mellitus* tipo 2 (Zucker Diabetic Fatty) em relação à expressão proteica de marcadores estruturais e funcionais no hipocampo. Neste estudo, foram usados ratos machos *Zucker Diabetic Fatty* diabéticos (ZDF/Gmi *fa/fa*) e controlo (ZDF/Gmi *+/+*), com 26 semanas de idade. Os ratos diabéticos apresentaram hiperglicémia e um elevado índice de insulinoresistência (HOMA-IR) quando comparados com os ratos controlo (26 semanas). Para avaliar a disfunção do hipocampo determinou-se a expressão de proteínas sugestivas de neurotoxicidade (1-GFAP, proteína estrutural astrocítica; 2-Bax e Bcl-2, marcadores apoptóticos; 3-RAGE, receptor dos produtos de glicação avançada) e marcadores da maquinaria excitotóxica (syntaxina, SNAP-25 - proteína de 25 kDa associada a sinaptossoma) por Western Blotting. Por último estudou-se a via de sinalização da insulina (IR β - receptor de insulina, subunidade β ; IRS-1 - substrato do receptor de insulina 1; IRS-1 pY⁶¹² - substrato do receptor de insulina 1 fosforilado na tirosina 612), utilizando a mesma metodologia. Os resultados obtidos mostraram que não existem alterações na expressão das proteínas em estudo no hipocampo dos ratos diabéticos quando comparados com os ratos controlo. Na sequência da ausência de evidência de disfunção neuronal e considerando que os teores plasmáticos de insulina são normais às 26 semanas foi avaliada a via de sinalização de insulina no hipocampo do modelo experimental em estudo. O facto de também não existirem alterações na via de sinalização da insulina pode explicar a inexistência de neurotoxicidade neste modelo animal.

Abstract

Diabetes mellitus increases the risk for central nervous system disorders like ischemic stroke, dementia and cognitive deficit. In such pathologies, the hippocampus, being an important player on learning and memory processes, presents more susceptibility. The purpose of this work was to characterize, for the first time, the Zucker Diabetic Fatty rats - a *diabetes mellitus* type 2 animal model - in terms of structural and functional changes in hippocampus. To this end, 26-weeks-old male Zucker Diabetic Fatty rats (ZDF/Gmi *fa/fa*) and control rats (ZDF/Gmi *+/+*) were used. The diabetic rats showed hyperglycaemia and high levels of insulin resistance (HOMA-IR), when compared with controls. In order to verify the hippocampus dysfunction, several proteins expression was determined by Western Blotting including neurotoxicity markers (1-GFAP, astrocytic structural protein; 2-BAX, Bcl-2, apoptotic proteins; 3-RAGE, receptor for advanced glycation end products) and exocytotic machinery markers (syntaxin and SNAP-25) by Western Blot. Insulin signalization pathway proteins (IR β ; IRS-1; IRS-1 pY⁶¹²) were also scrutinized. The results showed no changes in protein expression in the rat's hippocampus when compared with controls. As there was no evidence of neuronal dysfunction, and considering that insulin plasmatic levels are normal at 26 weeks, the insulin signalization pathway was studied in these animals. There were no abnormalities in this pathway, which can explain the lack of neurotoxicity in this specific animal model.

Índice de Figuras

Figura 1 – Vias metabólicas favorecidas pela hiperglicemia.	5
Figura 2 – Formação de produtos finais de glicação avançada.	6
Figura 3 – Isoformas do receptor RAGE.	8
Figura 4 – Interação AGE-RAGE.	9
Figura 5 – Monómero do receptor de insulina.	14
Figura 6 – Sinalização de receptor de insulina.	15
Figura 7 – Rato ZDF.	16
Figura 8 – Quantificação dos níveis de GFAP.	32
Figura 9 – Quantificação dos níveis da proteína RAGE.	33
Figura 10 – Quantificação dos níveis das proteínas Bax e Bcl-2.	34
Figura 11 – Quantificação dos níveis das proteínas syntaxina e SNAP-25.	35
Figura 12 – Quantificação dos níveis da proteína IR β .	36
Figura 13 – Quantificação dos níveis da proteína IRS-1	36
Figura 14 – Quantificação dos níveis de proteína IRS-1 pY ⁶¹²	37

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Lista de anticorpos primários utilizados no Western Blotting.	26
Tabela 2 – Peso corporal.	28

Índice de Gráficos

Gráfico 1 – Níveis de glicemia no soro.	29
Gráfico 2 – Valores séricos de Hemoglobina Glicosilada.	30
Gráfico 3 – Valores séricos de insulina.	31
Gráfico 4 – Avaliação da Resistência à insulina.	32
Gráfico 5 - Razão (IRS-1 pY ⁶¹²) /IRS-1.	37

Abreviaturas

AGEs	Produtos finais de glicação avançada
AP1	Proteína ativadora 1
AR	Aldose reductase
Aβ	Péptido beta-amilóide
BAD	<i>Bcl-2 associated death promoter</i>
BAK	<i>Bcl-2 homologous killer</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
BCA	Ácido Bicinconínico
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-xL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BH	<i>The Bcl-2 homology domain</i>
BID	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
BSA	Albumina Séica Bovina
CAPS	3-(cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid
CCL2	Ligando de quimiocina 2
CDC42	Ciclo de divisão celular 42
CML	Carboximetilisina
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DM1	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 1
DM2	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 2
DNRAGE	<i>RAGE dominant negative.</i>
Col-HDL	Colesterol das lipoproteínas de alta densidade
DTT	Ditiotreitol
ECF	<i>Enhanced Chemifluorescence</i>
EGR1	Early growth response protein 1
ELISA	Ensaio de imunoabsorção ligado a enzimas
ERK	Cinase de proteínas regulada por sinais extracelulares
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GFAP	Proteína Ácida Fibrilar Glial
GK	<i>Goto-Kakizaki</i>
GSH	Glutathiona, forma reduzida

GSSH	Glutathiona, forma oxidada
HbA1c	Hemoglobina Glicosilada
HOMA-IR	Índice de avaliação da insulino-resistência
ICAM1	Molécula de adesão intercelular-1
IR	Receptor de insulina
IRS	Substrato do receptor da insulina
IRS-1 pY⁶¹²	IRS-1 fosforilado na tirosina 612
IRβ	Receptor da insulina, subunidade β
JAK	Cinase de Janus
JNK	Cinase c-Jun N-terminal
KK	<i>Kuo Kondo</i>
LTP	Potenciação de longa duração
MAPK	Proteína cinase activada por mitogénos
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida
NF-κB	Factor nuclear kappa-B
\cdotOH	Radical Hidroxilo
O₂\cdot^-	Anião radical Superóxido
OH\cdot	Anião Hidroxilo
OLETF	Otsuka Long Evans Tokushima Fatty
PBS	Tampão fosfato salino
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinase
PKC	Proteína cinase C
RAGE	Receptor dos produtos finais de glicação avançada
RNS	Espécies reactivas de Azoto
ROS	Espécies reactivas de Oxigénio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDH	Sorbitol desidrogenase
SNAP-25	Proteína de 25 kDa associada a sinaptossoma
SNAREs	<i>soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptors</i>
SNC	Sistema nervoso central
sRAGE	RAGE solúvel

STAT	Transdutor do sinal e activador da transcrição
STZ	Estreptozotocina
TG	Triglicerídeos
VAMP	Proteína de membrana associada a vesículas
VCAM-1	Molécula de adesão vascular-1
ZDF	Zucker Diabetic Fatty

1. Introdução

1.1. Diabetes

A *diabetes mellitus* (DM) é um grupo de anomalias metabólicas, caracterizada por hiperglicemia, resultante de defeitos na secreção e/ou acção da insulina (Biessels et al., 2002; Ristow, 2004). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as maiores subclasses da DM incluem a *diabetes mellitus* tipo 1 (DM1), definida por uma deficiência dramática da insulina em resultado da destruição autoimune das células β do pâncreas, e a *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2). A DM2 foi tradicionalmente vista como uma patologia unicamente relacionada com a resistência à insulina e alterações na sua secreção. No entanto, esta visão está a ser rapidamente alterada. Actualmente, a DM2 é vista como uma combinação de alterações metabólicas, que inclui uma pré-diabetes e a síndrome metabólica (Biessels et al., 2002; McCall et al., 2004; van der heide et al, 2006). Numa fase prévia, a não utilização da insulina pelos órgãos alvo (resistência à insulina), tais como o músculo, o fígado e o tecido adiposo, para manutenção de uma normoglicemia, leva a um aumento da sua secreção pelas células β dos ilhéus pancreáticos. Esta fase é denominada de pré-diabetes e caracteriza-se pela anomalia da glicemia em jejum e diminuição da tolerância à glucose. Ao longo dos anos, o excesso da função provoca uma falência das células β e, conseqüentemente, uma diminuição da secreção da insulina que, por ter uma sensibilidade diminuída nos seus receptores, resulta em hiperglicemia. Inicia-se, assim, uma DM2 caracterizada pela disfunção das células β , pelo aumento da produção de glucose hepática e pelo aumento da resistência à insulina, inicialmente no músculo esquelético (McCall et al., 2004).

A insulino-resistência (ou resistência à insulina) é uma condição caracterizada por defeitos na acção da insulina em que níveis normais deste péptido não conseguem compensar o sinal para a absorção de glucose nos tecidos alvo (Ristow et al., 2004). O resultado é uma hiperglicemia na tentativa de manter uma normoglicemia. Esta resistência condiciona um aumento da libertação de insulina pelo pâncreas, até a capacidade de reserva ser excedida por conseqüências metabólicas, deixando a secreção de insulina de ser adequada (van der heide et al, 2006).

Enquanto os níveis de glucose aumentam, a intolerância à glucose e a DM2 evoluem. Desta forma, é possível desenhar um espectro contínuo de sensibilidade à insulina, indo de uma resposta normal de insulina até a uma insulino-resistência severa (Jellinger, 2007). Muitos mecanismos têm sido propostos para justificar a resistência à

insulina, tais como anomalias genéticas em proteínas da cascata de sinalização da insulina (ex: Receptor da insulina, IR) e aumento dos adipócitos viscerais (obesidade) (Groeneveld et al., 2002; Marrero e Stern, 2004; Groop et al., 2005).

A síndrome metabólica descreve um grupo de alterações metabólicas que, associada a factores de risco, tais como a resistência à insulina, o aumento dos triglicéridos (TG), a diminuição do colesterol das lipoproteínas de alta densidade (col-HDL) e a pressão arterial elevada, predispõem a doenças cardiovasculares e diabetes. Na presença destes factores verifica-se um risco aumentado de cerca de 1,5 a 3 vezes maior para desenvolver doença coronária e de um risco 3 a 5 vezes superior para a diabetes (Eckel, 2007).

A obesidade e o sedentarismo são factores de risco para a progressão da DM2. A diabetes pode levar a complicações microvasculares (retinopatia, nefropatia e neuropatia) e macrovasculares (doença da artéria coronária, doença arterial periférica) (Holman et al., 2008).

1.1.1. Prevalência

A prevalência de DM em todo mundo, para todos os grupos etários, foi estimada em cerca de 2,8% da população mundial no ano 2000, com um valor estimado de 4,4% da população mundial em 2030. Tal corresponde a cerca de 171 milhões de pessoas com DM no ano 2000, prevendo-se que ascenda a cerca de 366 milhões de pessoas em todo o mundo no ano 2030, de acordo com as previsões da OMS (Wild et al., 2004; Roglic et al., 2005). Percentualmente, a prevalência de DM é superior nos homens. No entanto, existem mais mulheres diabéticas, em todo o mundo. A mudança demográfica mais importante para o aumento da prevalência de DM em todo mundo é o envelhecimento populacional, traduzido no aumento da população com mais de 65 anos de idade (Wild et al., 2004). Apesar da prevalência de DM estar a aumentar na sua globalidade, a prevalência de DM2 tem aumentado mais do que a prevalência de DM1, devido à diminuição de actividade física e ao aumento dos níveis de obesidade populacional nos países desenvolvidos e também nos países em desenvolvimento que se vão tornando progressivamente industrializados (Powers et al., 2008). De acordo com o Estudo da

Prevalência da Diabetes em Portugal, 11,7% da população portuguesa é diabética, representando mais 5,2% do total em relação a 2006.

1.1.2. Diabetes e Sistema nervoso central

Com relevo para o nosso trabalho, a diabetes tem sido identificada como factor de risco para o declínio cognitivo, atrofia cerebral, encefalopatia e doença de Alzheimer. Neste contexto, pensa-se que a hiperglicemia desempenha um papel chave, através de efeitos tóxicos no tecido cerebral. Por exemplo, o excesso de glucose no cérebro, pode condicionar a formação de produtos finais de glicação avançada (AGES) (ver secção 1.2.2) que, sendo ligandos do receptor dos AGEs (RAGE- receptor dos produtos finais de glicação avançada) (ver secção 1.2.3), podem perpetuar a inflamação, aumentar o stress oxidativo e mediar a diminuição dos mecanismos de protecção celular (Bcl-2, proteína anti-apoptótica) (ver secção 1.3). Por outro lado, alterações nas vias de sinalização da insulina podem afectar directamente o cérebro, modulando a plasticidade sináptica (ver secções 1.5 e 1.6) (Biessels e Kappelle, 2005; Pasquier et al., 2006; Toth et al., 2007). No entanto, existem poucos estudos que esclareçam a relação entre diabetes e disfunção do SNC (sistema nervoso central).

1.2. Mecanismos de neurotoxicidade da glucose

1.2.1. Via do polioliol e Stress oxidativo

A hiperglicemia pode promover um fluxo excessivo da via do polioliol (sorbitol) (Figura 1), levando a um aumento de sorbitol e frutose nos neurónios. A acumulação de sorbitol resulta num aumento da pressão osmótica nos tecidos. A primeira enzima da via do polioliol é a aldose reductase que tem menor afinidade para a glucose comparativamente com a hexocinase. Visto que a maior parte da glucose presente nos neurónios é convertida a glucose-6-fosfato, pequenas quantidades de sorbitol são detectadas. Na ausência de insulina, os neurónios acumulam elevadas quantidades de glucose devido ao facto de a hexocinase estar saturada; assim, a via do polioliol pode ser favorecida. Esta via resulta num aumento do consumo de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida (NADPH), comprometendo o ciclo da glutathiona e condicionando a existência de stress oxidativo (Obrosova et al., 2002;

Vicent et al., 2005). Com efeito, a capacidade da enzima glutathiona peroxidase em metabolizar o peróxido de hidrogénio a água é reduzida, aumentando assim a passagem de peróxido de hidrogénio a radicais hidroxilos (reacção de Fenton). De facto, existem evidências, que implicam a via do polioliol no stress oxidativo. Por exemplo, ratos diabéticos tratados com o inibidor da aldolase reductase exibiram normalização da razão glutathiona reduzida (GSH) / glutathiona oxidada (GSSG) (indicador do estado redox da célula) (Tomlinson e Gardiner, 2008).

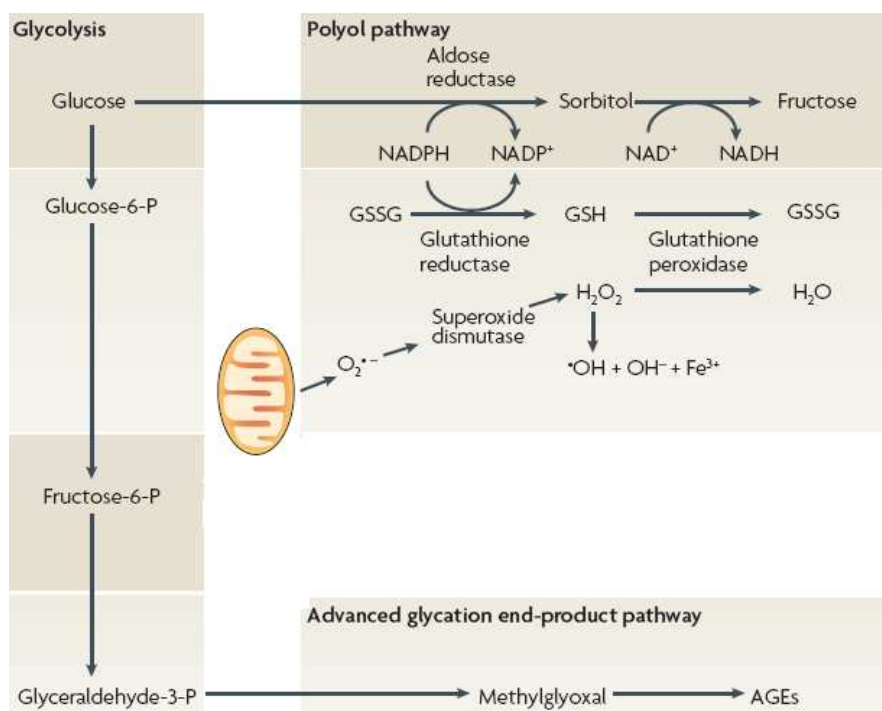


Figura 1 – Vias metabólicas favorecidas pela hiperglicemia (adaptado de Tomlinson e Gardiner, 2008).

1.2.2. Produtos finais de glicação avançada

Os AGEs, constituem uma grande variedade de substâncias, que resultam da adição de glucose ou de outros sacarídeos a proteínas, lípidos e nucleótidos (Lee e Cerami, 1989; Ulrich et al., 2000; Vincent et al., 2007). Os AGEs são expressos em todo o sistema nervoso (Toth et al., 2006).

A hipótese de Maillard para a formação de AGEs sugere que a modificação de proteínas por açúcares redutores (glicação de proteínas) na diabetes altera a estrutura e

função das proteínas nos tecidos, levando a posteriores complicações nesta patologia (Monnier, 1990; Meerwaldt et al., 2008). Segundo Maillard, a glucose forma produtos precoces de glicosilação reversíveis, com grupos amino reactivos em circulação (bases de Schiff), que subsequentemente, se rearranjam para formar produtos mais estáveis – produtos de Amadori [ex.: hemoglobina glicosilada (HbA1c)] (Baynes e Thorpe, 2000). O equilíbrio entre os níveis de bases de Schiff e de produtos Amadori, é alcançado em horas ou semanas, respectivamente. Posteriormente, os produtos de Amadori, continuam a sofrer uma série de rearranjos químicos lentos e complexos para formarem os AGEs. Uma vez formados, os AGEs são estáveis e virtualmente irreversíveis (Fig.2) (Aronson e Rayfield, 2002; Meerwaldt et al., 2008). Apesar de constituírem um largo número de estruturas químicas, os AGEs predominantes *in vivo* são as proteínas de carboximetilissina – CML (Aronson e Rayfield, 2002).

Contudo, os AGEs não são somente produzidos pela estimulação directa da glicação num contexto de hiperglicemia. Outro mecanismo para a formação de AGEs, é a inibição da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), que oxida o gliceraldeído-3-fosfato a 1,3-bifosfoglicerato). A inibição da GAPDH pode levar a um aumento dos níveis de gliceraldeído-3-fosfato, e consequentemente à formação de metilglioxal. O metilglioxal (forma de AGEs) encontra-se aumentado na diabetes, pela inibição da enzima GAPDH. (figura 1) (Nishikawa et al., 2000; Creager et al., 2005). Em ratos diabéticos induzidos com estreptozotocina (STZ), a actividade da GAPDH encontra-se reduzida no hipocampo (Toth et al., 2007).

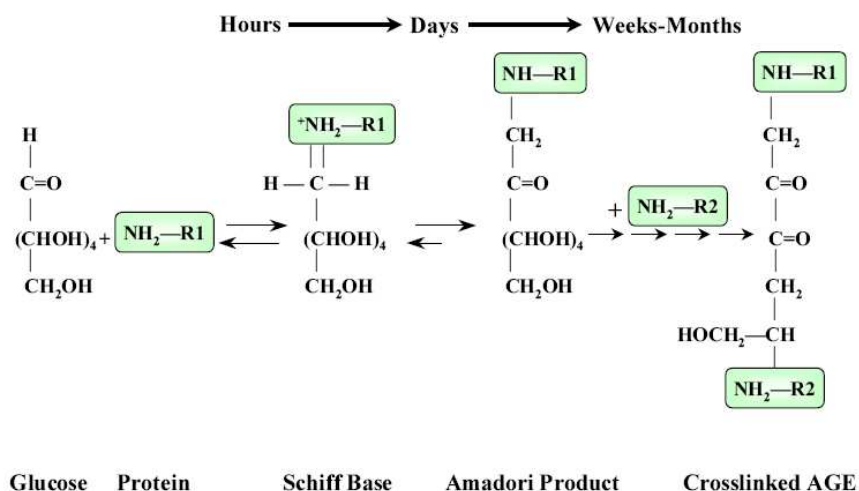


Figura 2 – Formação de produtos finais de glicação avançada (adaptado de Arason et al., 2002).

1.2.3. Receptor dos produtos finais de glicação avançada

O RAGE (Receptor dos produtos finais de glicação avançada) pertence à superfamília das imunoglobulinas, é um receptor multiligante, ou seja, liga-se a uma grande variedade de moléculas, sobretudo a ligandos que são passíveis de agregação e modificações pós-traducional (oxidação, glicosilação etc.). Este receptor é amplamente expresso no sistema nervoso central e periférico. Os AGEs, polipeptídeos S100/calgranulinas e o péptido β -amilóide (A β), são alguns exemplos de ligandos para o RAGE (Schmidt et al., 2001). A acumulação de AGEs leva ao aumento de RAGE no cérebro e noutros tecidos (Li e Schmidt, 1997; Hori et al., 1995; Wautier e Guillausseau, 2001; Lu et al., 2001).

Cada uma das isoformas do receptor RAGE possui uma região extracelular, que contém um domínio V (variável) e dois domínios C (constantes) e uma pequena cauda citoplasmática com 43 aminoácidos, sendo estes necessários para a sinalização intracelular (Wautier e Guillausseau, 2001; Ding e Keller, 2005; Schmidt e Stern, 2000). Acredita-se que o domínio tipo V seja o principal sítio para a ligação do ligando, embora provavelmente os domínios do tipo C desempenhem um papel fundamental na estabilização do domínio V (Ding e Keller, 2005).

Existem três principais isoformas de RAGE, resultantes de splicing alternativo; a forma RAGE *full-length*, RAGE *dominant negative* (DNRAGE) e RAGE solúvel (sRAGE). Pensa-se que estas três isoformas tenham a mesma afinidade de ligação para os ligandos de RAGE (Figura 3). Muitos estudos apontam a forma RAGE *full-length*, como mediador fisiológico, estando também envolvido em processos patológicos, tais como, quimiotaxia, angiogénese, inflamação, crescimento das neurites, apoptose e proliferação (Thornall, 1998; Schmidt et al., 2000; Schmidt et al., 2001). O RAGE *full-length* contém uma única região transmembranar, seguida de um pequeno domínio intracelular, que é necessário para a sinalização do RAGE, incluindo a activação do factor nuclear kappa-B (NF- κ B), proteína cinase activada por mitogénos (MAPK) e cinase c-Jun N-terminal (JNK) (Lue et al., 2009). Pensa-se que o domínio intracelular do receptor RAGE *full-length*, serve como um suporte para o início da transdução de sinal (Ishihara et al., 2003). Uma série de ligandos de RAGE, bem como a activação do RAGE por si próprio, pode induzir stress oxidativo (Mohamed et al., 1999; Morcos et al., 2002).

Uma vez que o sRAGE (que não possui o domínio transmembranar) e o DNRAGE (que não possui domínio intracelular), são capazes de suprimir a sinalização do RAGE *full-length*, é provável que uma das suas principais funções seja servirem de inibidores da activação do RAGE *full-length* (Schmidt et al., 2000; Ding e Keller, 2005).

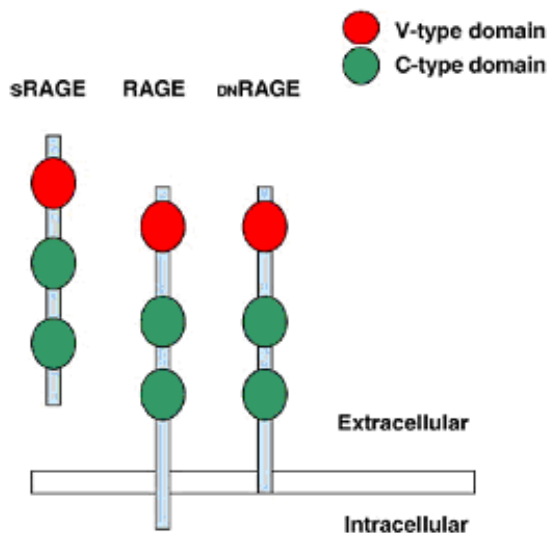


Figura 3 – Isoformas do receptor RAGE (adaptado de Ding et al., 2005).

O aumento da expressão de RAGE, tem sido associado com diversas patologias, incluindo a doença de Alzheimer, nefropatia diabética e reacções inflamatórias imunes das paredes dos vasos (Lue et al., 2009; Adami et al., 2004; Bianchi et al., 2007).

Os nervos de pacientes diabéticos apresentam reactividade imunológica aumentada para a CML e RAGE, consistente com a hipótese da via AGE-RAGE-NF- κ B (Figura 4), estar supra-regulada nos nervos periféricos dos diabéticos. Isto confirma que a via AGE-RAGE tem um papel importante em mecanismos que conduzem à neuropatia, especialmente deficits sensoriais, mas é improvável que seja o único factor responsável pela lesão neurológica progressiva na diabetes (Goh et al., 2008). No entanto, foi associada o aumento da expressão de RAGE na substância branca do SNC à DM (Toth et al, 2006).

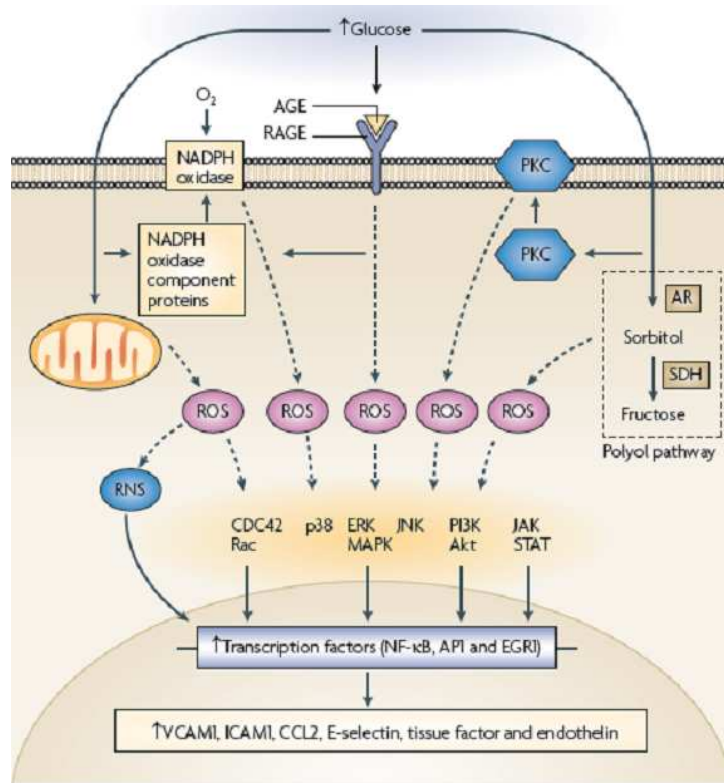


Figura 4 – Interação AGE-RAGE (adaptado de Calcutt et al., 2009).

1.3. Apoptose

A morte celular programada (apoptose) tem um papel fundamental no normal desenvolvimento, na homeostase dos tecidos, e na remoção de células danificadas. A perturbação do processo apoptótico normal pode ser uma das consequências da neurotoxicidade da glucose. A apoptose é comum na diabetes e desordens neurodegenerativas que afectam o SNC (Li et al., 2005). Com efeito, em estudos realizados em modelos animais demonstrou-se que o aumento da apoptose no SNC tem relação directa com a diabetes, quer insulino-dependente, quer insulino-resistente (Rizk et al, 2006).

Os elementos-chave que contribuem para a apoptose são organizados em duas principais famílias de proteínas, incluindo as enzimas caspases e a família Bcl-2 (B-cell lymphoma 2). As caspases são um dos principais executores do processo apoptótico, sendo a caspase 3 o membro mais importante desta família desempenhando um papel efectivo na apoptose em neurónios do SNC (Anarkooli et al., 2008).

A família de proteínas Bcl-2, reguladora crítica da apoptose, modula a homeostase mitocondrial, a libertação do citocromo c e suprime o dano oxidativo. Estas proteínas possuem pelo menos 1 de 4 domínios homólogos Bcl-2 (BH) conservados (BH1, BH2, BH3 e BH4) (Delft e Huang, 2006). Existem duas classes de proteínas reguladoras na família Bcl-2 com efeitos opostos na apoptose:

- Membros anti-apoptóticos: Bcl-2 e Bcl-xL (B-cell lymphoma-extra large), que geralmente possuem todos os 4 domínios BH e um domínio transmembranar (Petros et al., 2004). A sobre-expressão destas proteínas inibe a apoptose neuronal e não neuronal pelo bloqueio da libertação do citocromo c (Anarkooli et al., 2008). É sugerido que a Bcl-2 possui um papel na sobrevivência neuronal pós-mitótica, visto que ratos transgênicos que sobre-expressaram Bcl-2 tinham um número de neurónios mais elevado que o normal em muitas regiões do cérebro (Michaelidis et al., 1996).

- Membros pró-apoptóticos: são subdivididos em membros só BH3 (ex. *Bcl-2 associated death promoter* – BAD e *BH3 interacting domain death agonist* – BID), que contêm apenas domínios BH3, e membros de múltiplos domínios (*Bcl-2-associated X protein* – Bax e *Bcl-2 homologous killer* – BAK), que normalmente carecem de domínios BH4 (Delft e Huang, 2006).

Aquando dum sinal apoptótico (ex. stress oxidativo), a BAK e Bax deslocam-se para a mitocôndria, formando poros pelos quais o citocromo c é libertado (Wei et al., 2001). A Bcl-2 e Bcl-xL podem formar heterodímeros com a BAK e a Bax, prevenindo a sua deslocação para a mitocôndria, e a apoptose neuronal. O balanço entre as proteínas Bcl-2 anti e pró apoptóticas, pode determinar se uma célula vive ou morre (Green e Reed et al., 1998; Anarkooli et al., 2008).

Um aumento na expressão da Bax e diminuição da Bcl-2, foi descrito em ratos e humanos, no córtex cerebral expostos a A β (Wang et al., 2001).

1.4. Células da glia

As células da glia, descritas em 1885 como células não neuronais do sistema nervoso (Virchow et al., 1885), foram consideradas por muito tempo como tendo unicamente funções de suporte estrutural. Contudo, hoje é amplamente aceite que estas células desempenham também um papel chave na fisiologia do SNC (Eng et al., 2000).

No SNC existem dois tipos principais de glia, podendo ser distinguidos pelo tamanho e origem embrionária: macroglia e microglia. A macroglia, é constituída por células originárias da placa neural, inclui os astrócitos e oligodendrócitos que são os tipos de células gliais maiores. A microglia é composta por células de origem mesodérmica, diferindo assim de outros tipos de células do sistema nervoso que são ectodérmicas (Chan et al., 2007; Vallejo et al., 2010).

As células microgliais, ao contrário dos astrócitos e oligodendroglia, não estão directamente envolvidas na regulação da neurotransmissão e condução do impulso. Estas células possuem marcadores de células da linhagem de monócitos/macrófagos e produzem citocinas reguladoras do processo inflamatório. As células da microglia, exibem também receptores para neuropéptidos, neurotransmissores e transmissores libertados pelos astrócitos (Noda et al., 2000; Burnstock, 2006; Miguel-Hidalgo, 2009).

Os oligodendrócitos são responsáveis pela formação e manutenção da bainha de mielina que isola os axónios no sistema nervoso central (Chan et al., 2007).

1.4.1. Astrócitos

Os astrócitos são o tipo de células da glia mais abundante no sistema nervoso central, desempenham um papel chave no controlo da neurotransmissão, condução do impulso, desenvolvimento e formação de conexões sinápticas. Fornecem ainda suporte energético para a actividade neuronal (Perea e Araque, 2002; Miguel-Hidalgo, 2009; Milligan e Watkins, 2009). Adicionalmente os astrócitos expressam receptores de neurotransmissores incluindo receptores do glutamato, purinérgicos e da substância P (Milligan e Watkins, 2009). Visto que o glutamato não passa a barreira hematoencefálica, a transmissão excitatória depende fortemente do glutamato produzido pelos astrócitos (Takano et al., 2009). Similarmemente, a formação de múltiplos lípidos requeridos na sinapse, incluindo o colesterol, são produzidos pelos astrócitos (Pfrieger e

Barres, 1997; Takano et al., 2009). Os astrócitos possuem um papel fundamental na defesa antioxidante no cérebro, fornecendo aos neurónios substratos com funções antioxidantes (ex. glutatona). Em circunstâncias patológicas, a produção de espécies reactivas de oxigénio pode ultrapassar a capacidade das defesas antioxidantes levando ao stress oxidativo na célula e dano celular (Pekny e Nilsson, 2005).

1.4.2. Proteína Ácida Fibrilar Glial

A Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP) é uma proteína de filamento intermediário tipo III, sendo a principal constituinte de filamentos gliais nos astrócitos (Sarthy, 2007). Adicionalmente a GFAP é considerada um marcador molecular específico e fiável de células maduras da linhagem astrogliar (Lazzari e Franceschin, 2001).

Insultos químicos ou mecânicos para o cérebro podem causar alterações morfofuncionais permanentes no SNC, despoletando a reactividade dos astrócitos (Kunkler e Kraig, 1997). Um dos principais indicadores da reactividade da glia é o aumento da síntese de GFAP (Baydas et al., 2003; Baydas et al., 2005). Contudo, ainda não está perfeitamente esclarecido o papel dos astrócitos reactivos na progressão das patologias do SNC. Para além do aumento da expressão de GFAP, a sua diminuição pode também cursar com disfunção cerebral (Coleman et al., 2004). No estudo de Coleman et al., 2004, verificaram que em ratos diabéticos (induzidos com STZ), injectados com insulina, normalizavam os valores de GFAP.

É ainda de realçar que foi demonstrado que a insulina influenciou a morfologia e a função de astrócitos de rato em cultura bem como a expressão de GFAP (Coleman et al., 2004).

1.5. Proteína de 25 kDa associada a sinaptossoma e Sintaxina

A perda de sinapses correlaciona-se fortemente com a diminuição cognitiva (DeKosky e Scheff, 1990).

As moléculas pré-sinápticas sinaptobrevina [uma proteína de membrana associada a vesículas (VAMP)], sintaxina (associada à membrana plasmática) e a SNAP-25 (proteína de 25 kDa associada a sinaptossoma) (Thomson, 2000; Atwood e Karunanithi, 2002), também conhecidas como SNAREs (*soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptors*), são mediadores essenciais da fusão de vesículas e da exocitose (Söllner et al., 1993; Jahn e Scheller, 2006).

A sinaptofisina, que é uma vesícula sináptica associada a proteínas de membrana integrais, regula a montagem do complexo SNARE, pela ligação à sinaptobrevina evitando assim a sua ligação à sintaxina e SNAP-25 (Hinz et al., 2001; Gao et al., 2006).

Em suma, a SNAP-25 e a sintaxina têm um papel fundamental na neuroexocitose, fazendo a ponte entre as vesículas sinápticas e a membrana plasmática durante a exocitose regulada (Johansson et al., 2008; Giovanni et al., 2010).

1.6. Insulina e SNC

A insulina presente no cérebro deriva principalmente da sua síntese nas células β pancreáticas (Schlingkamp et al., 2000). Contudo, existem estudos que demonstram que a insulina pode ser sintetizada no cérebro, uma vez que esta hormona se encontra presente em elevadas concentrações no córtex e hipocampo (Hoyer, 2003).

A disfunção da sinalização pela insulina tem sido associada a inúmeras doenças neurodegenerativas e a défices de aprendizagem e memória. Adicionalmente a diminuição de insulina no SNC tem sido considerada um factor crucial para alterações funcionais no cérebro, uma vez que a insulina tem funções neurotróficas (Sima et al, 2004; Sugimoto et al., 2000).

1.6.1. Receptores de Insulina e Ligandos

A insulina exerce os seus efeitos por ligação a receptores específicos nas células (Huang et al., 2010). O receptor de insulina (IR) é expresso em quase todos os tecidos dos mamíferos, com uma maior concentração nos tecidos alvos de acção da insulina (músculo, tecido adiposo e fígado) (Ding et al., 2002). Os receptores de insulina estão amplamente expressos por todo o cérebro, com maior densidade no córtex cerebral, hipotálamo e hipocampo, onde exercerem uma série de funções (regulação do metabolismo da glucose, consumo de alimentos, aprendizagem e memória) (Huang et al., 2010),

O IR é um tetrâmero $\alpha 2/\beta 2$. As subunidades α são extracelulares e contêm sítios de ligação para a insulina. As subunidades β são proteínas transmembranares contendo domínios cinase de tirosina (Ding et al., 2002).

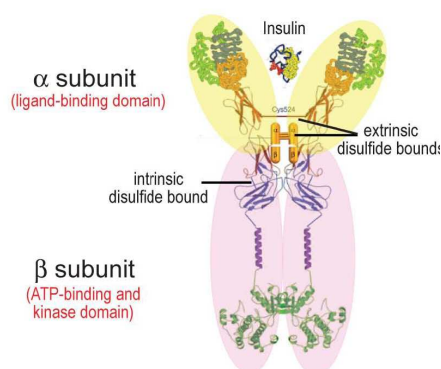


Figura 5 – Monómero do receptor de Insulina (adaptado de Chiu e Cline, 2010).

A ligação da insulina, activa uma rápida autofosforilação dos receptores, seguida da fosforilação da tirosina da família de proteínas dos substratos do receptor da insulina (IRS) (Ding et al., 2002). O IRS fosforilado liga-se a várias moléculas efectoras como a subunidade reguladora p85 da fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K), activando a PI3K, que por sua vez activa a proteína cinase C, e uma cinase proteica serina/treonina, a Akt/proteína cinase B (Huang et al., 2010).

A activação da PI3K é um dos primeiros passos na via de sinalização da insulina e desempenha um papel importante em muitas respostas reguladas pela insulina, incluindo a estimulação de captação de glucose, síntese de glicogénio, síntese de proteínas e expressão de genes (Ding et al., 2002; Chiu e Cline, 2010).

Outra grande via de sinalização do receptor da insulina está associada à activação da Ras/Raf, que activa a cascata das MAPK (Kahn e Suzuki, 2010) (Figura 5).

Todas as 4 proteínas IRS (1-4) foram identificadas no cérebro, embora as principais formas pareçam ser IRS-1 e IRS-2, tal como acontece na maioria dos tecidos sensíveis à insulina (Kahn e Suzuki, 2010; Huang et al., 2010). Um estudo recente sugere que a fosforilação dos resíduos de serina Ser^{307/612/632} em IRS-1, leva a uma diminuição da fosforilação dos resíduos de tirosina, e com isso aumenta o risco de aparecimento da DM2 (Tanti et al, 2004).

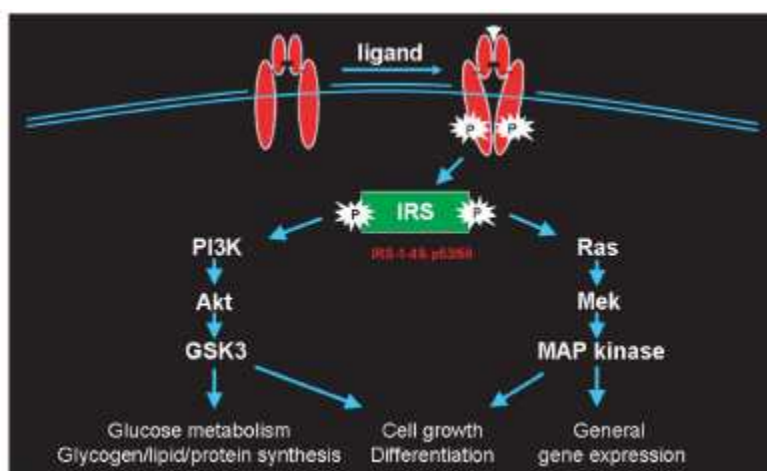


Figura 6 – Sinalização do receptor de insulina (adaptado de Chiu e Cline, 2010).

1.7. Modelos Animais na *Diabetes Mellitus* Tipo 2

Os modelos animais de DM2 tendem a ser tão complexos e heterogêneos como a condição humana. Em alguns animais a insulino-resistência é predominante, enquanto noutros a falha das células β é proeminente. Uma vez que a obesidade e posteriormente a insulino-resistência estão envolvidas na DM2 em humanos, os modelos animais de obesidade podem fornecer uma visão mais aprofundada da condição humana (Rees e Alcolado, 2005).

O modelo animal *Goto-Kakizaki rat* (GK), é predominantemente usado como modelo de DM2 não obeso. Este apresenta várias características da DM2, tais como moderada hiperglicemia, insuficiência da secreção de insulina em resposta à glucose, e insulino resistência periférica (Gauguier et al., 1996; Rees e Alcolado, 2005).

O modelo animal *Kuo Kondo* (KK) adulto, começa a ser obeso e resistente à insulina, com hiperinsulinemia, as células β dos ilhéus sofrem hiperplasia, e eventualmente apresentam hiperglicemia (Rees e Alcolado, 2005). Os modelos experimentais mais usados na DM2 são o rato OLETF (Otsuka Long Evans Tokushima Fatty) e GK. Ambos possuem linhagens de poliúria, hiperinsulinemia, hiperglicemia persistente, hipertrigliceridemia e obesidade moderada (Biessels et al., 2005).

1.7.1. Ratos Zucker Diabetic Fatty

Os ratos machos obesos Zucker Diabetic Fatty (ZDF, *fa/fa*; ZDF/ *Drt-fa*; ZDF/*Gmi-fa/fa*) (figura 7) apresentam uma mutação no gene *fa*, ou seja, no receptor de leptina, associado à obesidade e, conseqüentemente, a uma resistência à insulina. Assim, a leptina tem a sua acção diminuída, apresentando valores sanguíneos elevados. A leptina é considerada uma citocina pró-inflamatória e inibe o apetite e adiposidade e aumenta o gasto de energia (Holm et al., 2004; Wajchenberg, 2007). Os ratos machos homozigóticos recessivos (*fa/fa*) desenvolvem obesidade, resistência á insulina, dislipidemia, seguida de falha pancreática, com desenvolvimento visível de diabetes entre as 8 e as 10 semanas (Brussee et al., 2008; Russell et al., 2008). Os animais ZDF (*fa/+*) ou ZDF (*+/+*) são magros, permanecem normoglicemicos e não sofrem alterações ao longo do tempo, servindo como um grupo de controlo em estudos experimentais (Brussee et al., 2008; Hwang et al., 2008).

Os ratos obesos ZDF exibem deficiências electrofisiológicas no hipocampo, um centro crítico para a aprendizagem e memória, o que sugere que este modelo pode revelar-se útil para compreender as origens do défice cognitivo em humanos com anomalias semelhantes (Winocur et al., 2005).



Figura 7 – Rato ZDF (*Gmi fa/fa*). O fenótipo destes ratos é definido por cabeça preta, olhos pretos e uma risca preta ao longo do seu comprimento. Todo o resto do seu pêlo é branco.

2. Objectivos

2.1. Objectivo Geral

Avaliar, pela primeira vez, a existência de disfunção no hipocampo de um modelo animal de diabetes tipo 2 obeso (Zucker Diabetic Fatty).

2.2. Objectivos específicos

1. Caracterização do modelo diabético pela determinação do peso corporal dos animais, caracterização do perfil glicémico (glucose e hemoglobina glicosilada - HbA1c) e avaliação da insulinemia e do índice de avaliação da insulino-resistência (HOMA-IR).
2. Avaliação da disfunção no hipocampo dos ratos diabéticos [ZDF (fa/fa)] pela determinação da expressão proteica do marcador astrocítico (GFAP), de marcadores apoptóticos (Bax e Bcl-2), do receptor de produtos finais de glicação avançada (RAGE) e de marcadores das vesículas exocitóticas (SNAP-25 e syntaxina), por Western Blotting.
3. Estudo da expressão de proteínas envolvidas na cascata de sinalização da insulina (IR β , IRS-1 e IRS-1 fosforilado na tirosina 612) para se estabelecer uma relação entre a insulina e a disfunção no hipocampo do modelo experimental utilizado.

3. Materiais e Métodos

3.1. Animais

Neste estudo, foram usados ratos machos *Zucker Diabetic Fatty* diabéticos (ZDF/Gmi *fa/fa*) e controlo (ZDF/Gmi *+/+*) (Laboratórios Charles-River, Barcelona, Espanha). À chegada ao Instituto de Farmacologia e Terapêutica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, os animais tinham seis semanas de vida e um peso médio de $165,9 \pm 2,5$ para os ZDF (*fa/fa*) e $137,3 \pm 2,0$ para os animais ZDF (*+/+*).

Durante duas semanas os animais foram mantidos em período de quarentena com condições ambientais controladas [ciclo de luz (12h diurno/nocturno), com uma temperatura ambiente de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ e 60% de humidade] com acesso a água e comida, de forma a promover uma adaptação às condições de estabulação e tratadores.

Os animais foram alimentados com uma dieta “standard” de manutenção de animais de laboratório (AO4 Panlab, Barcelona, Espanha), com a seguinte composição centesimal: 16,1% de proteína bruta; 3,1% de lípidos; 3,9% de fibras e 5,1% de minerais.

Através de dados anteriores e do consumo alimentar recomendado pelos laboratórios fornecedores dos animais, concluiu-se que um aporte diário de 10g/100g de peso corporal seria o suficiente para garantir as necessidades alimentares diárias, sem restrição.

3.2. Grupos de estudo

- Grupo controlo ZDF (*+/+*) (n= 5);
- Grupo diabético ZDF(*fa/fa*) (n=4).

Ambos os grupos permanecem desde as 6 semanas de idade até às 26 semanas de idade, período no qual se procedeu á recolha do hipocampo por decapitação.

3.3. Determinação do peso corporal

Os animais foram pesados semanalmente, desde a sua chegada e durante todo o período experimental, numa balança analítica (KERN CB 6 K1, Alemanha). Aquando do sacrifício, os animais foram pesados no dia antes, de modo a que o jejum não interferisse com o peso corporal.

3.4. Avaliação da variação dos níveis de glicemia

Foram avaliadas as oscilações de glucose nos dois grupos de ratos, ao longo do estudo. A glicemia foi medida através de uma gota de sangue da veia caudal do rato e determinada com a ajuda do sistema One Touch Ultra (LifeScan, Jonhson and Jonhson, Portugal). Para os animais dos diferentes grupos, a glicemia era medida em jejum de 12 horas e posteriormente era feita uma média de cada grupo.

3.5. Sacrifício dos animais, colheita de sangue e região cerebral

Os animais foram sacrificados às 26 semanas de idade. Para permitir a obtenção de sangue, os ratos foram anestesiados com 2 ml/kg de uma solução 2:1 (v:v) de 50 mg/ml de cloridrato de cetamina (Ketalar®) em clorpromazina a 2,5% (Largactil®). O sangue foi recolhido da veia jugular, bastante visível, após pequena incisão, em seringas de 5ml com agulhas passadas em heparina (B Braun Melsungen AG, Alemanha).

Após colheita, o sangue foi distribuído por diferentes tubos, consoante as determinações analíticas pretendidas. Para a obtenção de soro, foi utilizado um tubo sem anticoagulante (BD Vacutainer®; SST™II Advance) e para a obtenção de plasma um tubo com Heparina-Lítio (Sarstedt, Monovette®).

Os animais foram sacrificados por decapitação e o seu hipocampo removido. As amostras foram armazenadas a -80C°.

3.6. Avaliação dos parâmetros bioquímicos

Os parâmetros bioquímicos foram avaliados recorrendo a diferentes tipos de amostras recolhidas de sangue total, plasma e soro. Para a determinação da glicemia, usou-se o soro utilizando-se um analisador automático (Roche Hitachi 717 analyser, Diamond Diagnostics Inc., Holliston, MA, EUA). Para a determinação da insulina, recorreu-se a uma amostra de plasma, pelo ensaio de imunoabsorção ligado a enzimas (ELISA). A hemoglobina glicosilada, foi determinada a partir de sangue total He-Li (Imunoaglutinação Analisador DCA 2000+).

3.6.1. Glucose

O doseamento da glucose foi efectuado recorrendo-se a um Kit comercial de glucose oxidase (Sigma, St. Louis, Mo, USA), que se baseia num teste colorimétrico enzimático. O princípio da reacção consiste na oxidação da glucose a gluconolactona, pela enzima glucose-oxidase na presença de oxigénio. Esta reacção resulta também na formação de peróxido de hidrogénio, que na presença da peroxidase, origina a 4-aminofenazona e fenol em 4-(p-benzoquinonamonoimino)-fenazona. Por análise fotométrica, é quantificada a intensidade cromática do corante vermelho formado, este é directamente proporcional à concentração de glucose.

3.6.2. Insulina

A insulina foi doseada por ELISA (Mercodia, Uppsala, Suécia), baseando-se na técnica de Sandwich directa, com dois anticorpos diferentes. Durante a incubação, a insulina da amostra reage com os anticorpos anti-insulina, que se encontram associados ao poço. Depois de uma lavagem e posterior limpeza dos anticorpos, o último anticorpo, com uma enzima conjugada liga-se à insulina. Esta enzima detecta-se por reacção com o 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). O ponto final da reacção obtém-se por ácido sulfúrico 1M, originando um composto corado, quantificado espectrofotometricamente.

3.6.3. HOMA-IR

Para a determinação do grau de insulino-resistência nos ratos ZDF (fa/fa) e no seu controlo ZDF (+/+) calculou-se o HOMA-IR, utilizando-se os valores de insulina obtidos no momento do sacrifício e de glucose obtidos na semana do sacrifício, após 12h de jejum. O HOMA-IR, ou índice de avaliação da insulino-resistência, foi calculado pela:

$$HOMA_{IR} = \frac{Insulina(\mu U / ml) \times Glucose(mmol / L)}{22,5}$$

3.6.4. Hemoglobina glicosilada

A hemoglobina glicosilada (HbA1c) é formada pela glicação não enzimática do terminal N da cadeia β da hemoglobina A. O nível de HbA1c é proporcional ao nível de glucose plasmática durante um período de dois meses, é aceitável caracterizar esta como um indicador da concentração média diária de glucose no sangue nos últimos meses.

Por diferenças existentes no doseamento da fracção A1c da hemoglobina de rato quando comparada com a de humano, tornou-se necessário a utilização de um método de imunoaglutinação, caracterizado pela utilização de um anticorpo monoclonal específico da HbA1c de rato.

A hemoglobina glicosilada (HbA1c) foi doseada em sangue total, utilizando o analisador DCA 2000+ (Bayer, Diagnostic, Alemanha). A percentagem de HbA1c na amostra é calculada pela seguinte equação:

$$\%HbA1c = \frac{[HbA1c]}{[Hemoglobina\ total]} \times 100$$

A hemoglobina total é quantificada por oxidação da mesma, através de um ferricianeto de potássio e resultando numa metahemoglobina. Esta forma complexos com o tiocianato, dando origem a uma espécie corada, com uma absorvância a 531nm.

Para a quantificação da HbA1c foi utilizada uma técnica de inibição da aglutinação em látex. Esta tem por base uma substância aglutinadora (um polímero sintético que contém múltiplas cópias da porção imunoreactiva da HbA1c) que provoca a aglutinação do látex revestido com o anticorpo monoclonal específico da HbA1c do rato. Esta reacção de aglutinação origina uma maior dispersão da luz, a qual é medida como um aumento da capacidade de absorção a 531nm. A HbA1c nas amostras de sangue total compete pelo número limitado de locais de ligação de anticorpos em látex, provocando uma inibição da aglutinação e uma menor dispersão da luz. A menor dispersão é medida como uma redução da capacidade de absorvância a 531nm. A concentração de HbA1c é, então, quantificada utilizando uma curva de calibração da capacidade de absorção *versus* concentração de HbA1c. A % de HbA1c foi calculada pela fórmula referida acima.

3.7. Preparação de extractos totais (lisados proteicos totais de hipocampo)

Após o isolamento da região cerebral pretendida (hipocampo), o tecido foi homogeneizado em tampão de lise (Tris- HCl 50 mM PH 7,4; 0,5% Triton X-100; 4°C), complementado com um cocktail de inibidores de proteases e fosfatases [fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1mM, ditioneitol (DTT) 1mM, 1µg/ml quimostatina, 1 µg/ml leupeptina, 1 µg/ml antipaina; 5 µg/ml de pepstatina A; fluoreto de sódio 50mM e ortovanadato 1mM]. O cocktail de inibidores de proteases/fosfatases, foi adicionado ao Tris-HCL-Triton X-100 imediatamente antes de usar. O tecido foi homogeneizado por sonicação (média de 3 pulsos). Seguidamente, os lisados foram centrifugados a 13000 rpm, durante 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante (extracto total) foi recolhido e conservado a -80°C. A concentração de proteína foi determinada usando o método de ácido bicinonínico (BCA) (Smith et al., 1985).

3.8. Electroforese em gel de poliacrilamida e Imunodeteção

As proteínas foram desnaturadas por fervura a 95°C durante 5 minutos, em solução desnaturante 6x (Tris-HCl 0,5M, pH 6,8; SDS (dodecil sulfato *de* sódio) 10% (m/v); glicerol 30 % (v/v), DTT 0,6M, azul de bromofenol 0,01 % (m/v), e separadas por electroforese em géis de poliacrilamida em condições desnaturantes, na presença de lauril sulfato de sódio (SDS), de acordo com procedimento descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). Os géis de separação foram preparados com 12 %, 8 % ou 7% de Bis-

acrilamida, conforme o peso molecular das proteínas de interesse. Na electroforese usou-se um tampão com Tris base 125 mM, glicina 100 mM, e SDS 0,50 % (m/v).

Seguidamente as proteínas foram transferidas do gel de poliacrilamida para membranas de difluoreto de polivinildieno (PVDF) previamente activadas em metanol, por electrotransferência. A transferência ocorreu durante 90min a 110v, em gelo. A composição do tampão usado na electrotransferência é a seguinte: CAPS 10mM, 2,5% (m/v) de SDS e metanol 20 % (v/v). Depois da transferência, as membranas foram bloqueadas com 5% (m/v) de leite magro ou 5% de albumina bovina (BSA), em 0,5% (v/v) de Tween 20 preparado em solução tampão fosfato - PBS (NaCl 136,8mM, KCl 2,6mM, Na₂HPO₄.2H₂O 12,7mM, KH₂PO₄ 1,8mM, pH 7,4) durante 1h, sob agitação á temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários (Tabela 1) diluídos numa solução de PBS-Tween com 0,5 % (m/v) de leite magro ou em 0,5% (m/v) de BSA durante a noite a 4°C. Após incubação com o anticorpo primário as membranas foram lavadas, durante 25 minutos (5 vezes durante 5 minutos) com solução PBS/Tween sob agitação e incubadas á temperatura ambiente durante 1 h, com anticorpo secundário marcado com fosfatase alcalina (1:10000, Santa Cruz Biotechnology ou 1:20000, Amersham, GE Healthcare Life Science, USA), diluído em 0,5 % (m/v) de leite magro em PBS-Tween (5%) ou em 0,5% (m/v) de BSA em PBS-Tween (5%). Depois de uma nova série de lavagens com 0,5% de PBS-Tween, durante 30min, as membranas foram reveladas com o reagente ECF (*Enhanced Chemifluorescence*) num detector Typhoon. Para a quantificação das bandas usou-se o software ImageQuant 5,0 da Molecular Dynamics.

Tabela 1 – Lista de anticorpos primários utilizados no Western Blotting.

Anticorpo Primário	Peso Molecular (KDa)	Concentração de proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Diluição	Referencia	Marca
<i>Rabbit anti-GFAP</i>	50	5	1:500	SC-9065	Santa Cruz Biotechnology
<i>Rabbit anti-RAGE(Full-length)</i>	46	5	1:500	SC-5563	Santa Cruz Biotechnology
<i>Mouse anti-sintaxina1</i>	37	5	1:20000	110011	Synaptic Systems
<i>Rabbit anti-IRS1</i>	150	5	1:1000	#06-248	Millipore
<i>Rabbit anti-IRβ</i>	89	5	1:1000	SC-711	Santa Cruz Biotechnology
<i>Rabbit anti-IRS-1(pY⁶¹²)</i>	150	5	1:1000	44816G	Invitrogene
<i>Mouse anti-β-actina</i>	42	-	1:20000	A5441	Sigma-Aldrich
<i>Rabbit anti-Bcl-2</i>	29	5	1:250	sc-783	Santa Cruz Biotechnology
<i>Rabbit anti-Bax</i>	20	5	1:250	sc-6236	Santa Cruz Biotechnology
<i>Mouse anti-SNAP-25</i>	25	5	1:20000	S5187	SigmaAldrich

3.9. Análise Estatística

Os resultados obtidos são expressos como média \pm SE (Erro padrão). Para a comparação entre grupos utilizou-se o teste t-student ou o teste ANOVA, seguido do teste *Post-hoc* Bonferroni. O software usado foi o GraphPad. O nível de significância considerado foi de $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Peso corporal

Tanto os animais diabéticos [ZDF (fa/fa)] como o grupo controlo [ZDF (+/+)], tiveram um aumento significativo do peso corporal ($p < 0,001$) entre as 8 e as 20 semanas de idade. Entre as 20 e as 26 semanas, o peso corporal dos animais diabéticos diminuiu ($p < 0,05$). Contrariamente, o grupo controlo, apresentou um aumento de peso ($p < 0,01$) no mesmo período de tempo.

Tabela 2 – Peso corporal. Os dados foram obtidos às 8, 20 e 26 semanas. As seguintes comparações entre grupos foram efectuadas: a – ZDF (fa/fa) vs ZDF (+/+) às 8 semanas; b – ZDF (fa/fa) vs ZDF (+/+) às 26 semanas; c – ZDF (+/+) às 20 semanas vs ZDF (+/+) às 8 semanas; d – ZDF (+/+) às 26 semanas vs ZDF (+/+) às 8 semanas; e – ZDF (fa/fa) às 20 semanas vs ZDF (fa/fa) às 8 semanas; f – ZDF (fa/fa) às 26 semanas vs ZDF (fa/fa) às 8 semanas; g – ZDF (+/+) às 26 semanas vs ZDF (+/+) às 20 semanas; h – ZDF (fa/fa) às 26 semanas vs ZDF (fa/fa) às 20 semanas Para a comparação entre grupos utilizou-se o teste ANOVA, seguido do teste *Post-hoc* Bonferroni. Os valores correspondem á média \pm SE. $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente para uma, duas ou três letras.

Tempo	8 Semanas		20semanas		26 semanas	
	Controlo ZDF (+/+) (n=5)	Diabéticos ZDF (fa/fa) (n=4)	Controlo ZDF (+/+) (n=5)	Diabéticos ZDF (fa/fa) (n=4)	Control ZDF (+/+) (n=5)	Diabéticos ZDF (fa/fa) (n=4)
Peso (g)	223,8⁺3,6	271,9⁺2,3^{aa}	406,8⁺7,9^{ccc}	396,0⁺10,0^{eee}	445,7⁺8,2^{ddd gg}	363,7⁺11,8^{bbb fff h}

A média do peso corporal foi significativamente mais elevada para os animais diabéticos [ZDF (fa/fa)] comparando com a média do peso corporal dos animais controlo ($p < 0,01$), às 8 semanas de idade. No tempo 20 semanas não existem diferenças significativas do peso corporal entre o grupo diabético e o grupo controlo. Às 26 semanas de idade dos animais, a média do peso corporal foi significativamente mais baixa nos animais diabéticos comparativamente com a média do peso para os animais controlo ($p < 0,001$).

4.2. Glicemia

A determinação da concentração de glucose no soro foi efectuada às 11, 19 e 26 semanas de idade dos animais. Ao comparar o grupo diabético [ZDF (fa/fa)] com o grupo controlo [ZDF (+/+)], verificou-se que o controlo tem uma glicemia constante (cerca de 90 mg/dl) ao longo do estudo, ao contrário dos animais diabéticos, que mostraram uma hiperglicemia gradual ao longo da idade (gráfico 1). Verificou-se ainda que a média da glicemia foi significativamente mais elevada para os animais diabéticos

comparativamente com a média da glicemia dos animais controlo, às 11, 19 e 21 semanas de idade. A hiperglicemia nos ratos diabéticos atingiu o seu valor mais elevado no final do estudo (26 semanas de idade).

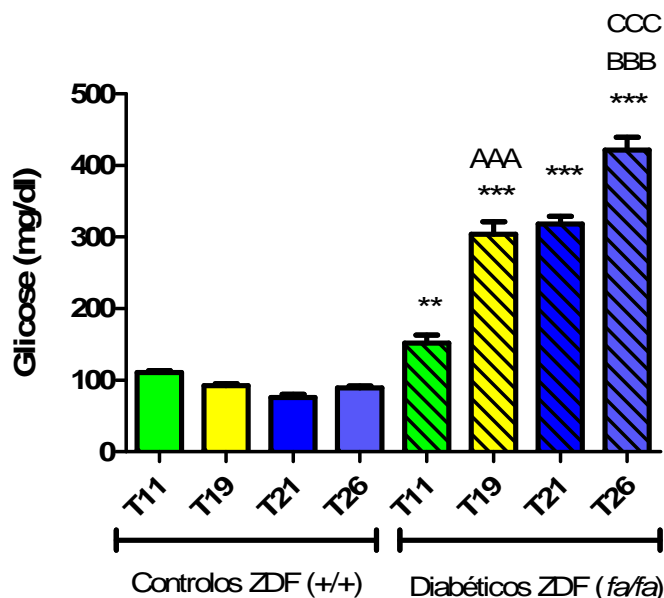


Gráfico 1 – Níveis de glicemia (mg/dl) no soro às 11, 19, 20 e 26 semanas. Foram efectuadas as seguintes comparações entre grupos: A- ZDF (fa/fa) 19 semanas vs ZDF (fa/fa) 11 semanas; B- ZDF (fa/fa) às 26 semanas vs ZDF(fa/fa) às 21 semanas; C- ZDF (fa/fa) 26 semanas vs ZDF (fa/fa) 11 semanas *- ZDF (fa/fa) vs ZDF (+/+) (comparados na mesma semana de idade). Os valores correspondem à média \pm SE. Para a comparação entre grupos utilizou-se o teste ANOVA, seguido do teste *Post-hoc* Bonferroni. $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente para um, dois ou três caracteres.

4.3. Hemoglobina glicosilada (HbA1c)

Nas 26 semanas de idade, a média da hemoglobina glicosilada foi significativamente mais elevada para os animais diabéticos ($10,2 \pm 0,3$; $p < 0,001$) comparando com a média da hemoglobina glicosilada dos animais controlo ($3,96 \pm 0,1$), confirmando-se a desregulação da glicemia.

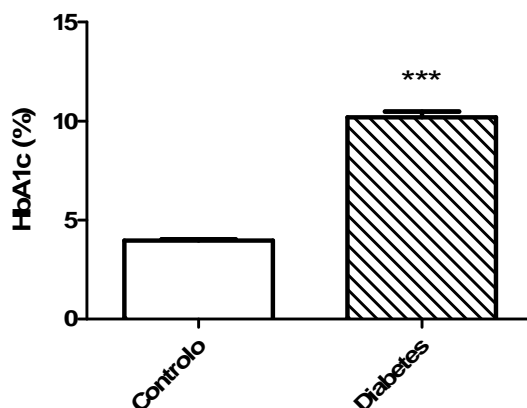


Gráfico 2 – Valores séricos de Hemoglobina Glicosilada (HbA1c) nos ratos controlo [ZDF(+/+); n=5] e diabéticos [ZDF(fa/fa); n=4], no tempo final (26 semanas). Os valores correspondem á média \pm SE. Para comparar os dois grupos utilizou-se o teste t de student. ***, $p < 0,001$.

4.4. Insulina

A concentração sérica de insulina nos ratos diabéticos [ZDF (fa/fa); $5,5 \pm 0,02$ $\mu\text{g/l}$; $p < 0,001$] com 8 semanas de idade diferiu significativamente da apresentada pelos ratos controlo [ZDF (+/+); $2,8 \pm 0,2$ $\mu\text{g/l}$] com a mesma idade, sendo que nestes ratos não diabéticos observam-se valores de insulinemia inferiores vs diabéticos. A hiperinsulinemia verificada nos ratos diabéticos às 8 semanas de idade, diminuiu comparativamente com as 20 semanas de idade ($1,5 \pm 0,4$ $\mu\text{g/l}$; $p < 0,001$). No grupo controlo observou-se uma ligeira diminuição dos níveis de insulina às 20 semanas ($0,8 \pm 0,1$ $\mu\text{g/l}$; $p < 0,05$) (gráfico 3). No tempo final (26 semanas) os ratos ZDF (fa/fa) exibiram uma diminuição dos níveis de insulina ($0,8 \pm 0,03$ $\mu\text{g/l}$; $p < 0,001$) comparativamente com os ratos ZDF (fa/fa) às 8 semanas. No tempo final do estudo, não se verificaram alterações significativas nos níveis de insulina entre o grupo diabético ($0,8 \pm 0,03$ $\mu\text{g/l}$) e o grupo controlo ($1,05 \pm 0,3$ $\mu\text{g/l}$).

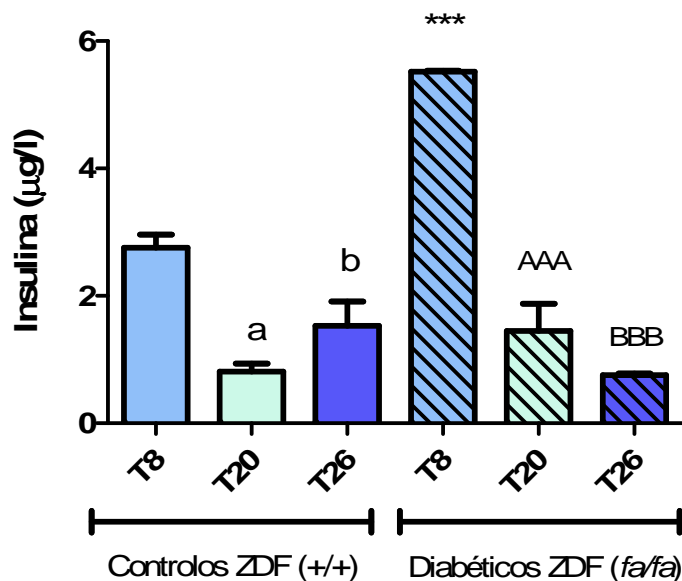


Gráfico 3 – Valores séricos de insulina ($\mu\text{g/l}$) nos ratos controlo [ZDF (+/+)] e diabéticos [ZDF (fa/fa)] às 8, 20 e 26 semanas de idade. Foram efectuadas as seguintes comparações: a- ZDF (+/+) 20 semanas vs ZDF (+/+) 8 semanas; b- ZDF (+/+) 26 semanas vs ZDF (+/+) 8 semanas; *- ZDF (+/+) vs ZDF (fa/fa) às 8 semanas de idade; A- ZDF (fa/fa) 20 semanas vs ZDF (fa/fa) 8 semanas; B- ZDF (fa/fa) 26 semanas vs ZDF (fa/fa) 8 semanas. Os valores correspondem á média \pm SE. Para a comparação entre grupos utilizou-se o teste ANOVA, seguido do teste *Post-hoc* Bonferroni. $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente para uma, duas ou três letras.

4.5. Resistência à insulina – HOMA-IR

A sensibilidade (resistência) destes animais à insulina foi avaliada pelo índice HOMA-IR. Para o seu cálculo foram utilizados os níveis de glucose e insulina dos ratos ZDF (fa/fa) e seu grupo controlo (+/+) no tempo final (semana 26), após 12h em jejum (no caso da glicemia). No tempo final do estudo, verificou-se que os valores de HOMA-IR dos animais diabéticos ($19,5 \pm 0,5$; $p < 0,001$) eram significativamente superiores aos valores dos animais controlo ($5,7 \pm 0,9$) (Gráfico 4).

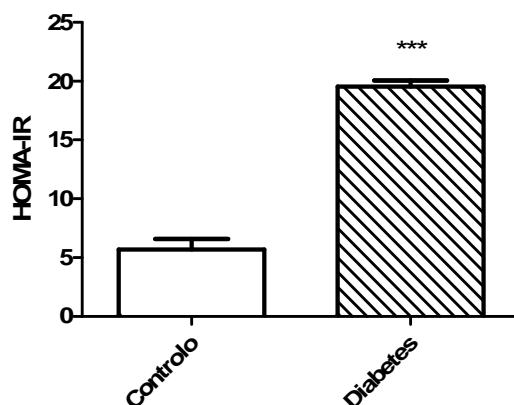


Gráfico 4 – Avaliação da Resistência à insulina através do índice de insulino-resistência (HOMA-IR: $mmol/l.\mu U/ml$) de ratos ZDF (+/+) e ZDF (fa/fa) no tempo final (26 semanas de idade). Os valores correspondem á média \pm SE. Para comparar os dois grupos utilizou-se o teste t de student. *** P <0,001.

4.6. Expressão de proteína GFAP

A expressão da proteína GFAP no hipocampo de ratos diabéticos [ZDF (fa/fa); 72,5 \pm 11,2 % do controle] não é significativamente diferente em relação à dos ratos controle da mesma idade (26 semanas). Contudo, existe uma tendência para a diminuição dos valores desta proteína na região cerebral em estudo (figura 11).

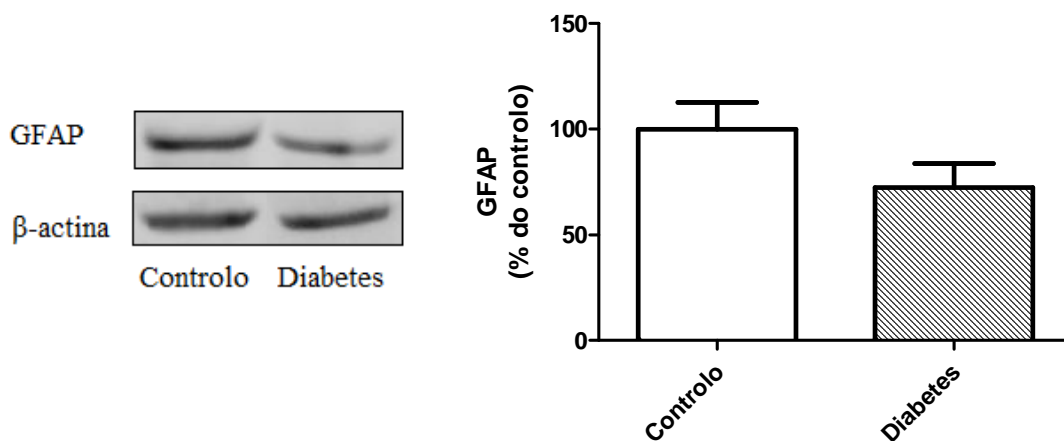


Figura 8 – Quantificação dos níveis da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) em extractos totais de hipocampo de ratos diabéticos e controles às 26 semanas de idade. A expressão dos níveis de GFAP (50KDa) e β -Actina (42KDa) foi analisada por Western Blotting. O *blot* apresentado é representativo de duas experiências independentes. Os resultados são expressos em percentagem média do controle \pm SE. Para comparar os dois grupos [Controle (n=5) / Diabetes (n=4)] utilizou-se o teste t de student (significativo se p <0,05).

4.7. Expressão da proteína RAGE

Ao avaliar o efeito da diabetes na expressão da proteína RAGE (*Full-length*) no hipocampo de rato, verificou-se que não existem diferenças significativas entre o grupo diabético ($106,3 \pm 5,486$ % do controlo) e o grupo controlo (figura 12).

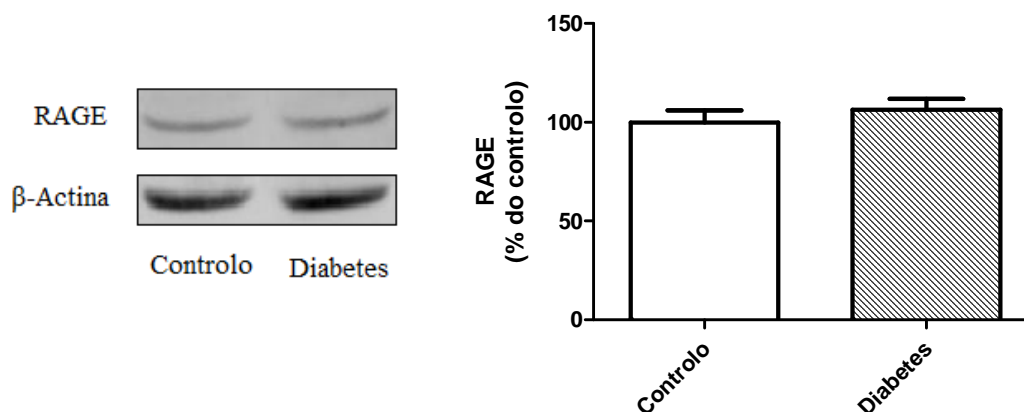


Figura 9 – Quantificação dos níveis da proteína RAGE (receptor de produtos finais de glicação avançada- *Full-length*) em extractos totais de hipocampo de ratos diabéticos e controlos às 26 semanas de idade. A expressão dos níveis de RAGE (46 KDa) e β-Actina (42KDa) foi analisada por Western Blotting. O *blot* apresentado é representativo de duas experiências independentes. Os resultados são expressos em percentagem média do controlo ± SE. Para comparar os dois grupos [Controlo (C; n=5) / Diabéticos (D; n=4)] utilizou-se o teste t de student (significativo se $p < 0,05$).

4.8. Expressão das proteínas Bax e Bcl-2

A expressão das proteínas pró-apoptótica Bax e anti-apoptótica Bcl-2 no hipocampo de ratos diabéticos não exibiu diferenças estatisticamente significativas comparativamente com o grupo controlo às 26 semanas de idade ($90,0 \pm 7,6$ e $99,8 \pm 9,5$ % do controlo, respectivamente) (figura 10 A e B). A razão Bax/Bcl-2 (índice de morte celular por apoptose), também não exibiu diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (figura 10 C).

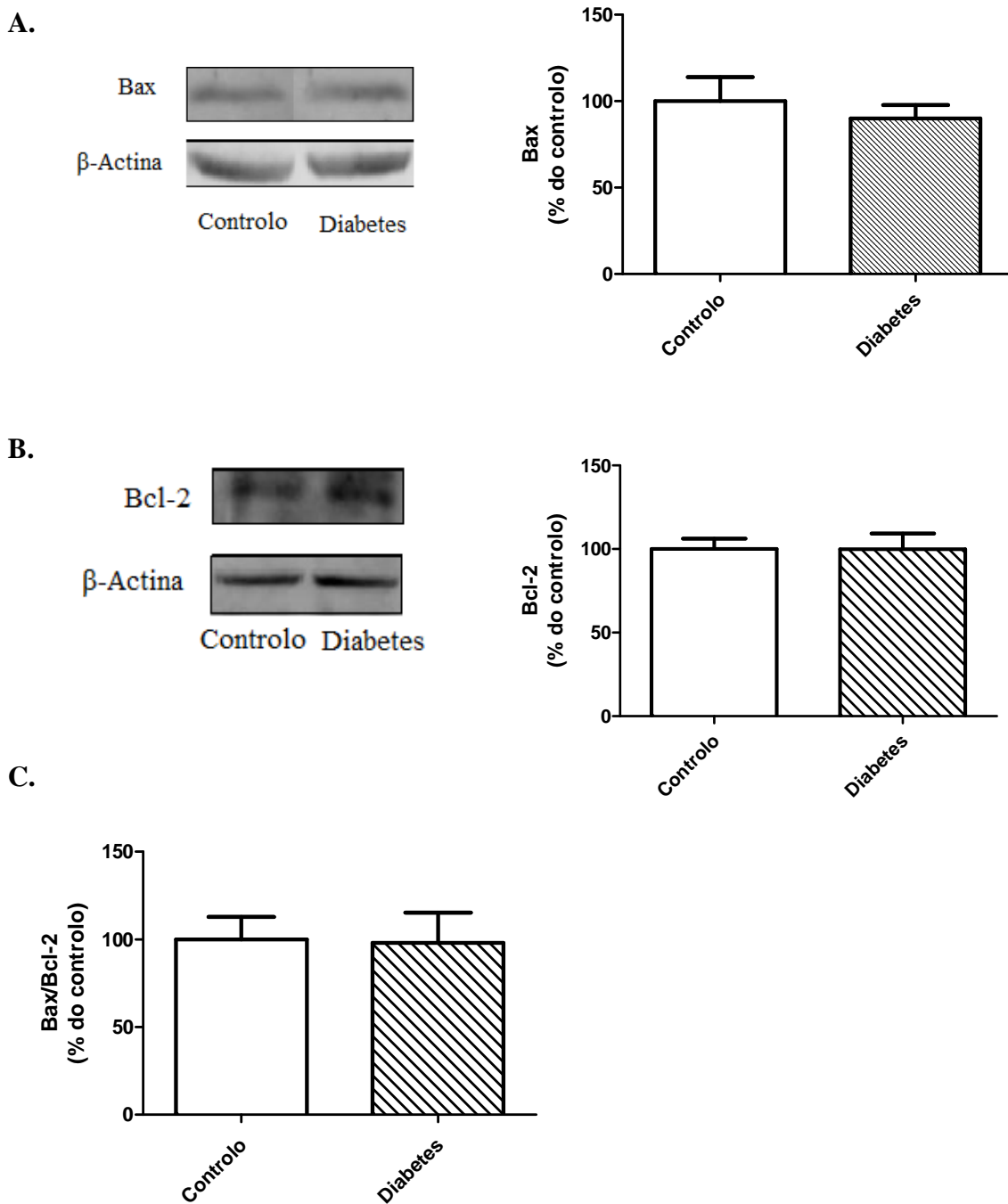


Figura 10 – Quantificação dos níveis da proteína Bax e Bcl-2 em extractos totais de hipocampo de ratos diabéticos e controlo às 26 semanas de idade. (A) Expressão dos níveis de Bax (20 KDa) e β -Actina (42KDa) [controlo (C; n=5); Diabetes (D; n=4)] ; (B) Expressão dos níveis de Bcl-2 (29 KDa) e β -Actina (42KDa) [Controlo (n=4); Diabetes (n=4)], por Western Blotting. O blot apresentado é representativo de duas experiências independentes. (C) Razão Bax/Bcl-2. Os resultados são expressos em percentagem média do controlo \pm SE. Para comparar os dois grupos utilizou-se o teste t de student (significativo se $p < 0,05$).

4.9. Expressão das proteínas Sintaxina e SNAP-25

A expressão das proteínas sintaxina e SNAP-25 (proteína associada ao sinaptossoma de 25KDa) no hipocampo de ratos diabéticos não exibiu diferenças estatisticamente significativas comparativamente com o grupo controle (figura 11 A, B) ($91,5 \pm 3,6 \%$ e $85,1 \pm 11,0 \%$ do controle, respectivamente).

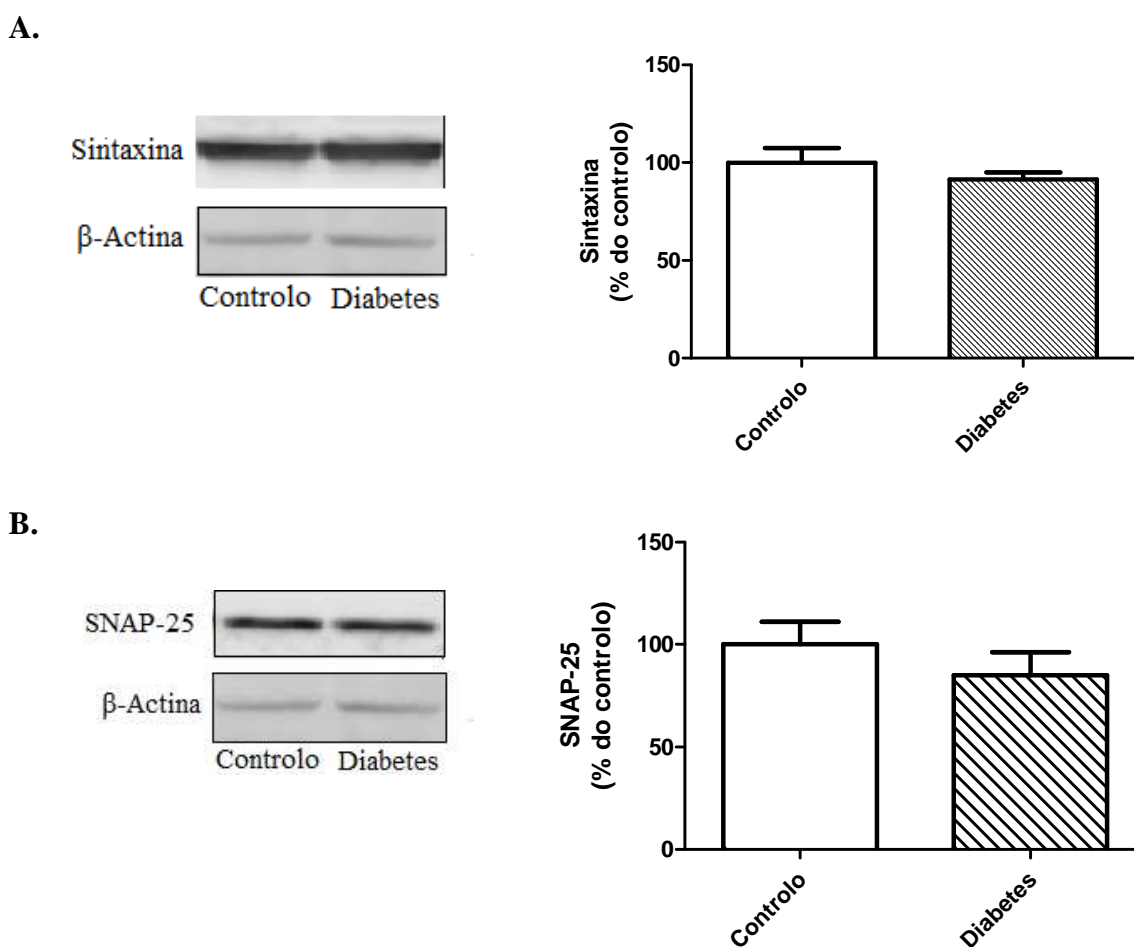


Figura 11 – Quantificação dos níveis das proteínas sintaxina e SNAP-25 em extractos totais de hipocampo de ratos diabéticos e controlo às 26 semanas de idade por Western Blotting. (A) Expressão dos níveis de Sintaxina (37KDa) e β -Actina (42KDa) no grupo controlo (C; n=5) e diabético (D; n=4). O *blot* é representativo de duas experiências independentes. (B) Expressão dos níveis da proteína SNAP-25 (25 KDa) e β -Actina (42KDa) no grupo controlo (C; n=4) e diabético(D; n=4). Os resultados são expressos em percentagem média do controlo \pm SE. Para comparar os dois grupos utilizou-se o teste t de student (significativo se $p < 0,05$).

4.10. Expressão de IR- β

A expressão da proteína IR- β no hipocampo de ratos diabéticos [ZDF (fa/fa); $108,0 \pm 3,8$ % do controlo] não é estaticamente diferente da dos ratos controlo com a mesma idade (26 semanas) (figura 12).

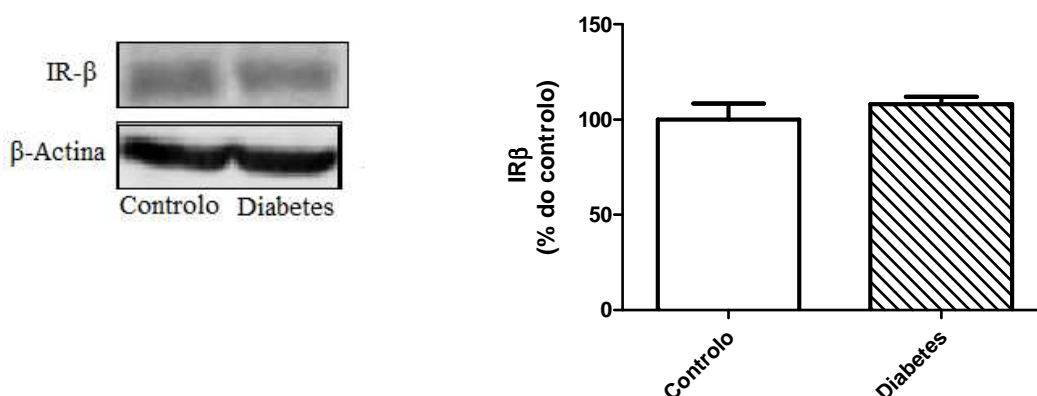


Figura 12 – Quantificação dos níveis da proteína IR β em extractos totais de hipocampo no grupo controlo (C; n=5) e diabético (D; n=4) às 26 semanas de idade. A expressão dos níveis de IR β (89 KDa) e β -Actina (42KDa) foram analisadas por Western Blotting. O *blot* é representativo de duas experiências independentes. Os resultados são expressos em percentagem média de controlo \pm SE. Para comparar os dois grupos utilizou-se o teste t de student (significativo se $p < 0,05$).

4.11. IRS-1

A expressão da proteína IRS-1 no hipocampo de ratos diabéticos (ZDF (fa/fa); $99,2 \pm 9,7$ % de controlo) não apresentou diferenças estatisticamente significativas em relação à dos ratos controlos da mesma idade (26 semanas) (figura 13).

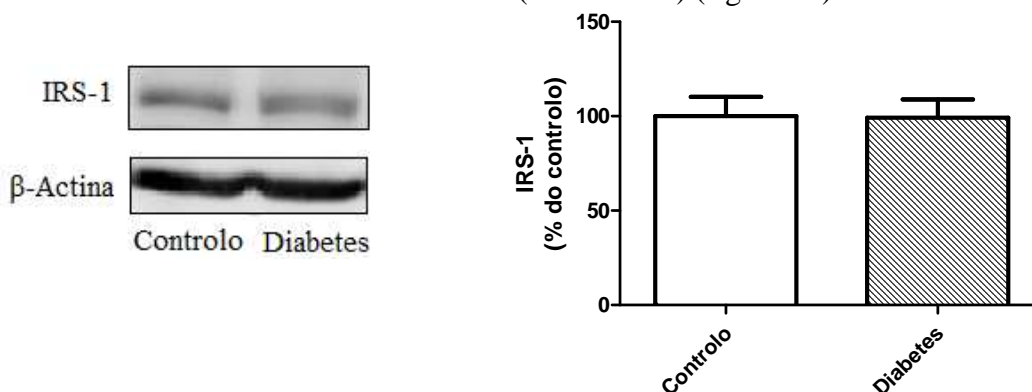


Figura 13 – Quantificação dos níveis da proteína IRS-1 em extractos totais de hipocampo de ratos diabéticos (D; n=4) e controlo (C; n=5) às 26 semanas de idade. A expressão dos níveis de IRS-1 (150 KDa) e β -Actina (42KDa) foram analisadas por Western Blotting. O *blot* é representativo de duas experiências independentes. Os resultados são expressos em percentagem média de controlo \pm SE. Para comparar os dois grupos utilizou-se o teste t de student (significativo se $p < 0,05$).

4.11.1. IRS-1 fosforilado na tirosina 612 (IRS-1 pY612)

A expressão da proteína IRS-1 pY⁶¹² (fosforilação da tirosina 612 de IRS-1) no hipocampo de ratos diabéticos [ZDF (fa/fa); 102,9 ± 15,6 % de controlo] não apresentou diferenças estatisticamente significativas em relação à dos ratos controlo com a mesma idade (26 semanas) (figura 14).

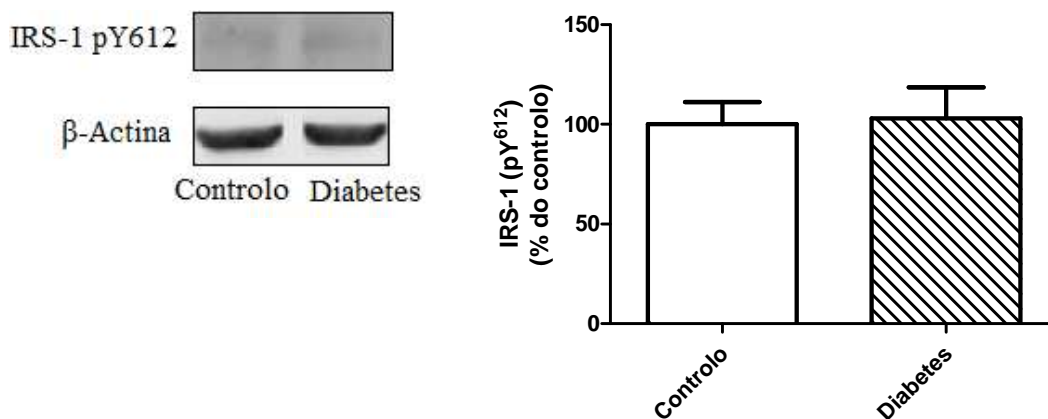


Figura 14 – Quantificação dos níveis da proteína IRS-1 pY⁶¹² em extractos totais de hipocampo de ratos diabéticos (n=4) e controlo (n=5) às 26 semanas de idade. A expressão dos níveis de IRS-1 pY⁶¹² (150 KDa) e β-Actina (42KDa) foi analisada por Western Blotting. O *blot* ilustra duas experiências independentes. Os resultados são expressos em percentagem média de controlo ± SE. Para comparar os dois grupos utilizou-se o teste t de student. (significativo se p <0,05).

4.11.2. Razão (IRS-1 pY612) /IRS-1

A razão (IRS-1 pY612) /IRS-1 não é estatisticamente diferente entre os grupos estudados (81,3 ± 13,9 % do controlo).

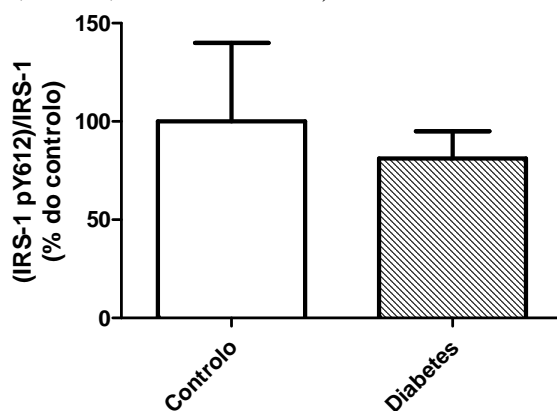


Gráfico 5 - Razão (IRS-1 pY612)/IRS-1 no grupo diabético (n=4) e controlo (n=5). Os resultados são expressos em percentagem média do controlo ± erro. Utilizou-se o teste t de student (significativo se P <0,05).

5. Discussão

Ao longo dos últimos anos tem surgido um maior interesse no impacto da diabetes no cérebro, uma vez que há evidências que esta patologia afecta o sistema nervoso central. Em particular, a diabetes aumenta o risco para isquémia, demência e declínio cognitivo, por mecanismos celulares que não estão completamente elucidados (Toth et al., 2006).

O modelo ZDF (fa/fa) obeso (mutação no gene fa do receptor da leptina) foi escolhido uma vez que mimetiza a *diabetes mellitus tipo 2* (DM2) em humanos. Este modelo apresenta entre as 7 e 10 semanas de idade, uma hiperinsulinemia, uma intolerância à glucose e hiperglicemia, e uma resistência periférica à insulina. A resistência à insulina ocorre em duas fases: primeiro desenvolvem hiperinsulinemia, seguida de uma insulinopenia relativa (20 semanas), causada pela diminuição das células β pancreáticas (Smith et al., 2003). A insulino-resistência bem como a obesidade são factores de risco para declínio cognitivo (Winocur et al., 2005). No presente estudo escolheram-se as 26 semanas para mimetizar uma diabetes a longo prazo. A região cerebral seleccionada para este estudo foi o hipocampo uma vez que é extremamente importante para os processos de aprendizagem e memória, podendo estar comprometida na DM2 (Moult e Harvey, 2008). Por exemplo, da escassa informação sobre alterações neuronais nos ratos ZDF (fa/fa), destacar-se-ia o estudo de Winocur et al. (2005) demonstrando que este modelo apresenta deficiências electrofisiológicas no hipocampo, aos 4 meses de idade.

No presente estudo os animais diabéticos mostraram uma hiperglicemia gradual ao longo do tempo de estudo, assim como uma maior HbA1c às 26 semanas. Por sua vez os animais controlo mantiveram-se normoglicémicos.

Em relação à insulina verificou-se que nas 8 semanas os animais diabéticos apresentavam uma hiperinsulinemia. Os níveis de insulina dos ratos diabéticos, diminuíram entre as 8 e 20 semanas. Os ratos diabéticos apresentaram uma tendência para insulinopenia comparativamente com o grupo controlo nas 20 semanas de idade. Contudo, havendo tendência para insulinopenia às 26 semanas, não há diferenças estatisticamente significativas entre os animais diabéticos e os animais controlo. Os animais diabéticos apresentaram ainda um elevado índice de insulino-resistência avaliado pelo HOMA-IR para este tempo em estudo. O peso corporal dos ratos diabéticos evoluiu acentuadamente na fase inicial, o que é característico da obesidade e

diabetes. Contudo na fase mais avançada da diabetes, verificou-se uma diminuição de peso, sendo este um dos principais sintomas de doença agravada. Estes dados validam o modelo de DM2 [ZDF (fa/fa)].

Inicialmente, avaliou-se a expressão de marcadores de neurotoxicidade e de função sináptica (GFAP, RAGE, Bax, Bcl-2, SNAP-25 e syntaxina) com o objectivo de verificar se existiam alterações patológicas no hipocampo do modelo animal de DM2. Tendo em conta que a insulina é neuroprotectora, e que os seus níveis às 26 semanas ainda são normais, fomos estudar a via de sinalização da insulina (IR β , IRS-1 e IRS-1 pY⁶¹²) para tentar explicar a ausência de alterações nos marcadores da função neuronal.

Considerando que os astrócitos desempenham um papel fulcral no normal funcionamento do SNC, estudou-se a expressão da GFAP que é um marcador molecular específico destas células gliais (Lazzari e Franceschin, 2001). Alterações da sua expressão são sugestivas de neurotoxicidade. Por exemplo, ratos knockout para GFAP, demonstraram alterações na potenciação de longa duração (LTP), implicando um papel potencial nos processos de aprendizagem e memória (McCall et al., 1996). No presente trabalho verificou-se que a diabetes induziu uma diminuição da expressão de GFAP no hipocampo que, no entanto, não atingiu significância estatística. Sendo a literatura omissa relativamente à expressão desta proteína em modelos de DM2, os estudos em modelos de DM1 induzida por estreptozotocina (STZ) são controversos. Se por um lado, Coleman et al. (2004) demonstraram que a diabetes tipo 1 leva a uma diminuição dos níveis de GFAP em astrócitos do córtex cerebral, hipocampo e cerebelo, por outro lado, o estudo de Baydas et al. (2005) reportou um aumento dos níveis de GFAP nas mesmas áreas cerebrais.

Existe uma estreita associação entre a hiperglicemia crónica e as complicações a longo prazo tanto na DM1 como na DM2. Os níveis de glucose podem estar aumentados até três vezes dentro do hipocampo de ratos com diabetes comparando com ratos controlo, isto poderá criar uma acumulação rápida de AGEs no cérebro diabético (Toth et al., 2007; van der heide et al., 2004). O RAGE é um receptor multiligante, que se liga a uma grande variedade de moléculas incluindo AGEs, polipeptídeos S100/calgranulinas e o péptido β -amilóide (A β) (Schmidt et al.,2001). A expressão do RAGE é largamente determinada pelos níveis dos seus ligandos. Com efeito, estes podem estimular a expressão do seu receptor (Liu et al.,2009). A interacção de AGE com o RAGE pode modificar a expressão de citocinas pró-inflamatórias, aumentar a

produção de radicais livres, induzir ligações irreversíveis com proteínas da matriz extracelular, e modificar vias de sinalização intracelular acopladas ao factor de transcrição NF- κ B (Toth et al., 2006; Schmidt et al., 2001). Por sua vez a expressão do RAGE é regulada pelo NF- κ B, o que poderá explicar a sua elevada expressão em tecidos diabéticos como o cérebro (Li e Schmidt, 1997). Uma vez que os ratos diabéticos apresentaram elevados níveis de HbA1c (produtos de glicação), seria expectável que ocorresse sobre-expressão de RAGE no hipocampo do modelo em estudo. No entanto, não se observaram alterações da expressão desta proteína nesta região cerebral nos ratos diabéticos [ZDF (fa/fa)] comparativamente com os respectivos controlos [ZDF (+/+)]. Isto poderá relacionar-se com o facto de não haver uma acumulação de AGEs no hipocampo destes ratos: se por um lado, a glucose poderá estar a ser metabolizada normalmente no cérebro, por outro lado a via NF- κ B não foi sobre-activada. De forma consistente com os nossos resultados, a expressão de NF- κ B e de RAGE ficou inalterada, em neurónios ganglionares da raiz dorsal em ratos diabéticos (ZDF (fa/fa)) (Brussee et al., 2008). Ao contrário, a expressão de RAGE é sobre-regulada no hipocampo de ratos diabéticos com insulinopenia absoluta (DM1 induzida por STZ; Toth et al., 2007).

Foi demonstrado que a apoptose neuronal é um factor significativo nas deficiências neurológicas associadas à diabetes (Rizk et al., 2006). Pretendendo-se avaliar a apoptose no hipocampo de ratos ZDF (fa/fa), estudou-se a expressão de um marcador anti-apoptótico (Bcl-2) e de um marcador pró-apoptótico (Bax). Verificou-se, que não existiram alterações significativas nos níveis de expressão destes marcadores no hipocampo do modelo diabético em comparação com o controlo. Avaliando-se a razão Bax/Bcl- 2 (índice de morte celular por apoptose), também não existiram diferenças significativas entre os grupos. A hiperglicemia não induziu apoptose nos animais diabéticos ao contrário de outros estudos que mostram que a hiperglicemia induz apoptose (Anarkoli et al., 2008). De facto, estes autores demonstraram que a indução de diabetes por STZ está associada com o aumento da razão Bax/Bcl-2 no hipocampo. Para além da hiperglicemia, a deficiência em insulina/péptido c pode desempenhar um papel preponderante na apoptose (White et al., 2000). Adicionalmente, estudos *in vitro* têm demonstrado que a insulina tem um efeito anti-apoptótico (Lee-Kwon et al., 1998; Bertrand et al., 1999; Li et al., 2003). Considerando que às 26 semanas o modelo animal estudado tinha valores normais de insulina, poder-se-ia admitir que este péptido está a

exercer uma função neuroprotectora no hipocampo. Para além de marcadores de neurotoxicidade, também se avaliou marcadores da função sináptica, em particular a SNAP-25 e syntaxina. A perda de sinapses correlaciona-se fortemente com a diminuição cognitiva (DeKosky e Scheff, 1990). Por exemplo, no hipocampo de pacientes com esquizofrenia a SNAP-25 encontra-se reduzida (Young et al., 1998). A SNAP-25 e a syntaxina têm um papel fundamental na neuroexocitose, fazendo a ponte entre as vesículas sinápticas e a membrana plasmática durante a exocitose regulada (Johansson et al., 2008; Giovanni et al., 2010). No presente estudo não se verificaram alterações nos níveis das proteínas syntaxina e SNAP-25 no hipocampo de ratos diabéticos [ZDF (fa/fa)]. Este facto é sugestivo da ausência de disfunção sináptica no hipocampo deste modelo animal. Por oposição ao presente estudo, Nitta et al. (2002) verificaram que a expressão das proteínas syntaxina e sinaptofisina são significativamente reduzidas no hipocampo de ratos DM1 (STZ). O encadeamento desta informação reforça a sugestão do papel neuroprotector da insulina. Assim, na ausência de evidência de neurotoxicidade e de disfunção neuronal investigaram-se as vias de sinalização da insulina. No cérebro, o complexo insulina/IR (receptor de insulina) encontra-se abundantemente distribuído nas membranas sinápticas do córtex cerebral e hipocampo. O receptor de insulina é uma tirosina cinases, que se auto-fosforila depois da activação pelo ligando, resultando no reconhecimento dos substratos do receptor de insulina (IRS-1 e IRS-2) (White, 2002). O IRS-1 é fosforilado nas tirosinas, permitindo o recrutamento das proteínas contendo domínios SH2, incluindo PI3K (Sun et al., 1995). Há, conseqüentemente, activação das vias de sinalização responsáveis pelas acções pleiotrópicas da insulina, como por exemplo, estimulação da captação de glucose, síntese de glicogénio, síntese de proteínas e expressão de genes (Virkamaki et al., 1999). Reduções significativas de IRS-1 e 2 são encontradas no cérebro de doentes de Alzheimer, acompanhadas pelo aumento do fosfo IRS-1 citosólico (Ser312 e Ser616) (Ma et al., 2009). No presente trabalho, não se observaram alterações nos níveis do receptor de insulina ($IR\beta$), no IRS-1 e IRS-1 pY⁶¹². e na razão (IRS-1 pY612/ IRS-1). Isto é consistente com o facto da expressão de $IR\beta$ não estar alterada em hipocampo de ratos ZDF (Winocur et al.; 2005). Este corpo de informação é fortemente sugestivo que uma parte da via de sinalização da insulina não se encontra alterada no hipocampo de ratos diabéticos ZDF (fa/fa). Defeitos nos IRS contribuem para a insulino-resistência em modelos animais diabéticos (Saad et al., 1992). Apesar de os ZDF (fa/fa) apresentarem insulino-resistência periférica, o mesmo parece não ocorrer no hipocampo

destes animais, visto não haver alterações na razão (IRS-1 pY612/ IRS-1). Foi demonstrado que o receptor da insulina está diminuído no hipocampo de ratos DM1, sugerindo que a perturbação da via de sinalização da insulina é causada não só por insulinopenia, mas também pela diminuição na expressão do seu receptor, e que tal facto é importante no fenómeno apoptótico do SNC na diabetes (Li et al., 2002).

Em suma, foi demonstrado que apesar de existir hiperglicemia, o que seria um possível catalizador de neurotoxicidade, a insulina poderá ser a chave para o facto de não existirem alterações nos parâmetros avaliados. Não existe expressão aumentada de RAGE, visto que, provavelmente, ao não existirem alterações no $IR\beta$, IRS-1 e no IRS-1 pY⁶¹² - activador da via PI3-K, responsável pelo metabolismo da glucose - não existirá excesso de glucose no cérebro. A insulina pode ainda inibir a apoptose, o que poderá explicar o facto de não existirem alterações da razão Bax/Bcl-2. A ausência de alteração na expressão de GFAP confirma a não evidência de neurotoxicidade. Os níveis de syntaxina e SNAP-25 não se encontram alterados, sugerindo que não existe disfunção sináptica no hipocampo dos ratos ZDF (fa/fa).

No entanto não se pode excluir a hipótese de existência de neurotoxicidade e/ou disfunção no hipocampo para tempos mais tardios onde provavelmente haverá insulinopenia.

6. Conclusão

A caracterização do modelo animal de DM2, demonstrou que não existe neurotoxicidade no hipocampo, uma vez que não se verificaram alterações nos níveis de GFAP, RAGE, razão Bax/Bcl-2, SNAP-25 e syntaxina às 26 semanas de idade. Ao verificar este facto, avaliou-se a expressão de proteínas envolvidas na cascata de sinalização da insulina (IR β , IRS-1 e IRS-1 pY⁶¹²), verificando-se que esta não se encontrava alterada. Apesar de os animais diabéticos apresentarem hiperglicemia e insulino-resistência periférica, o mesmo parece não ocorrer ao nível do SNC. Isto provavelmente prende-se com a insulina, que é um factor neurotrófico ou seja neuroprotectora. Contudo, após as 26 semanas, não se pode afirmar que não existam alterações ao nível do SNC.

7. Bibliografia

Bibliografia

Adami, C.; Bianchi, R.; Pula, G.; Donato, R.. “S100B-stimulated NO production by BV-2 microglia is independent of RAGE transducing activity but dependent on RAGE extracellular domain.” *Acta Biochim. Biophys.* 2004. **1742**:169–177.

Anarkooli, I.; Sankian, M.; Varasteh, A.; Haghiri, H.. “Evaluation of Bcl-2 Family Gene Expression and Caspase-3 Activity in Hippocampus STZ-Induced Diabetic Rats.” *Experimental Diabetes Research*. 2008.1-6.

Aronson, D.; Rayfield, E.. “How hyperglycemia promotes atherosclerosis: molecular Mechanisms”. *Cardiovascular Diabetology*. 2002.**1**: 1-10.

Atwood, H.; Karunanithi, S.. “Diversification of synaptic strength: presynaptic elements. *Nat Rev Neurosci*. 2002. **3**:497–516.

Bertrand, F.; Desbois-Mouthon, C.; Cadoret, A.; Prunier, C.; Robin, H.; Capeau, J.; Atfi, A.; Cherqui, G.. “Insulin antiapoptotic signalling involves insulin activation of the nuclear factor kappaB-dependent survival genes encoding tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 and mang manganese-superoxide dismutase.” *J. Biol. Chem*. 1999. **274**:30596– 30602.

Brussee, V.; Guo, G.; Dong, Y.; Cheng, C.; Martinez, J.; Smith, D.; Glazner, G.; Fernyhough, P.; Zochodne, D.. “Distal degenerative sensory neuropathy in a long-term type 2 diabetes rat model.” *Diabetes*. 2008. **57**(6):1664-73.

Baydas, G.; Reiter, R.; Yasar, A.; Tuzcu, M.; Akdemir, I.; Nedzvetskii, V.. “Melatonin reduces glial reactivity in the hippocampus, cortex, and cerebellum of streptozotocin-induced diabetic rats.” *Free Radic Biol Med*. 2003. **35**(7):797-804.

Baynes W.; Thorpe, R.. “Glycooxidation and lipoxidation in atherogenesis.” *Free Radic Biol Med*. 2000.**28**:1708-1716.

Baydas, G., Sonkaya, E.; Tuzcu, M.; Yasar, A.; Donder, E.. “Novel role for gabapentin in neuroprotection of central nervous system in streptozotocine-induced diabetic rats.” *Acta Pharmacol Sin*. 2005. **26**(4):417-22.

Bianchi, R.; Adami, C.; Giambanco, I.; Donato, R.. “S100B binding to RAGE in microglia stimulates COX-2 expression”. *Journal of Leukocyte Biology*. 2007. **81**:108-118.

Biessels, G.; van der Heide, L.; Kamal, A.; Bleys, R.; Gispen, W.. “Ageing and diabetes: implications for brain function”. *European Journal of Pharmacology*. 2002.**441**: 1-14.

Biessels, G.; Kappelle, L.. “Increased risk of Alzheimer’s disease in Type II diabetes: insulin resistance of the brain or insulin-induced amyloid pathology?”.. *Biochemical Society Transactions*. 2005. **33** (5):1042-1044.

Burnstock, G.. “Historical review: ATP as a neurotransmitter.” *Trends Pharmacol.* 2006.**27**(3):166–176.

Chiu, S.; Cline, H.. “Insulin receptor signaling in the development of neuronal structure and function”. *Chiu and Cline Neural Development* .2010. **5**:7.

Calcutt, A.; Cooper, M.; Kern, T.; Schmidt, A..“ Therapies for hyperglycaemia-induced diabetic complications: from animal models to clinical trials.” *Nature Reviews Drug Discovery*.2009. **8**: 417-430.

Coleman, E.; Judd, R.; Hoe, L.; Dennis, J.; Posner, P.. “Effects of diabetes mellitus on astrocyte GFAP and glutamate transporters in the CNS.” *Glia*. 2004. **48**(2):166-78.

Creager, A.; Luscher, F.; Cosentino,F.; Beckman, J.. “Diabetes and Vascular Disease: Pathophysiology, Clinical Consequences, and Medical Therapy.”*Circulation*.2003.**108**: 1527-1532.

Delft, M.; Huang, C.. “How the Bcl-2 family of proteins interact to regulate apoptosis.” *Cell Research*.2006. **16**: 203-213.

DeKosky, S.; Scheff, S.. “Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer’s disease: correlation with cognitive severity.” *Ann Neurol*.1990.**27**:457– 464.

Ding, V; Qureshi, S.; Szalkowski, D; Li, Z.; Biazzo-Ashnault, D; Xie, D;Kun Liu, K.; Brian Jones, A; Moller, D.;Zhang, B.. “Regulation of Insulin Signal Transduction Pathway by a Small Molecule Insulin Receptor Activator.” *Biochemical Journal*. 2002. 367:301-306.

Ding, Q.; Keller, J.. “Evaluation of rage isoforms, gands, and signaling in the brain.” *JN. Biochimica et Byophysica Acta*. 2005.**1746**:18-27.

Gauguier, D.; Froguel, P.;Parent, V.; Bernard, C.; Bihoreau, M.; Portha, B.; James, M.; Penicaud, L.; Lathrop, M.; Ktorza, A.. “Chromosomal mapping of genetic loci associated with noninsulin dependent diabetes in the GK rat.” *Nat Genet*. 1996.**12**: 38–43.

Gao, Y.; Bezchlibnyk, Y.; Sun, X.; Wang, J.; McEwen, B.; Young, L.. “Effects of restraint stress on the expression of proteins involved in synaptic vesicle exocytosis in the hippocampus.” *Neuroscience*. 2006. **141**(3):1139-48.

Giovanni, J.; Iborra, C.; Maulet, Y.; Leveque, C.; El Far, O.; Seagar, M.. “Calcium-dependent regulation of SNARE-mediated membrane fusion by calmodulin.” *J Biol Chem*.2010.

Goh, S.; Cooper, M.. “The Role of Advanced Glycation End Products in Progression and Complications of Diabetes.” *J Clin Endocrinol Metab*.2008. **93**: 1143–1152.

Haslbeck, K.; Bierhaus, A.; Erwin, S.; Kirchner, A.; Nawroth, P.; Schlotzer, U.; Neundorfer, B.; Heuss, D.. “Receptor for advanced glycation endproduct (RAGE)-

mediated nuclear factor- κ B activation in vasculitic neuropathy.” *Muscle Nerve* 2004.**29**:853–860.

Groop, H; Forsblom, C; Thomas C.. “Mechanisms of disease: Pathway-selective insulin resistance and microvascular complications of diabetes.” *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.*2005. **1**(2):100-110.

Groeneveld, J.; Beishuizen, A.; Visser, F.. “Insulin: a wonder drug in the critically ill?”. *Critical Care.*2002. **6**:102-105.

Hendrik Gispen, W.; Biessels, G.. “ Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus.” *Trends in Neurosciences.*2000. **23**: 542-549.

Hinz, B.; Becher, A.; Mitter, D.; Schulze, K.; Heinemann, U.; Draguhn, A.;Ahnert-Hilger, G..“Activity-dependent changes of the presynaptic synaptophysin-synaptobrevin complex in adult rat brain.” *Eur J Cell Biol.*2001. **80**:615–619.

Holm, A.; Johansen, P.; Ahnfelt-Rønne, I.; Rømer, J.. “Adipogenic and orexigenic effects of the ghrelin-receptor ligand tabimorelin are diminished in leptin-signalling deficient ZDF rats.” *European Journal of Endocrinology.* 2004. **150**: 893–904.

Hori, O.; Brett, J.; Slattery, T.; Cao, R.; Zhang, J; Chen, J.; Nagashima, M.; Erik, L; Vijay, S.; Nitecki, D.; Morser, J.; Stern, D.; Schmidt, A.. “The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphoterin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of rage and amphoterin in the developing nervous system.” *J Biol Chem.* 1995.**270**:25752-25761.

Hoyer, S.. “Memory function and brain glucose metabolism.” *Pharmacopsychiatry.* 2003. **36**:62-7.

Huang, C.; Lee, C.; Hsu, K.. “The Role of Insulin Receptor Signaling in Synaptic Plasticity and Cognitive Function”. *Chang Gung Med J.* 2010.**33**:115-25.

Hwang, I.; Kim, I.; Kim, Y.; Yi, S.; Lee, Y.; Ju, E.; Lee, I.; Park, I.; Won, MH, Yoon Y.; Seong ,J.. “Effects of methimazole on the onset of type 2 diabetes in leptin receptor-deficient rats.” *J Vet Med Sci.* 2009. **71**(3):275-80.

Ishihara, K.; Tsutsumi, K.; Kawane, S.; Nakajima, M.; Kasaoka,T.. “The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) directly binds to ERK by a D-domain-like docking site, *FEBS Lett.* 2003.**550**:107–113.

Johansson, J.; Ericsson, J.; Janson, J.; Beraki, S.; Stanić, D.; Mandic, S.; Wikström, M.; Hökfelt, T.; Ogren, S.; Rozell, B.;Berggren, P.; Bark,C.. “An Ancient Duplication of Exon 5 in the Snap25 Gene Is Required for Complex Neuronal Development/Function.” *PLos Genet.* 2008. **4**(11): e1000278.

Jahn, R.,;Scheller, R.. “SNAREs-engines for membrane fusion.” *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006. **7**:631–643.

Kahn, C.; Suzuki, R.. “Insulin Action in the Brain and the Pathogenesis of Alzheimer’s Disease.” *Research and Perspectives in Alzheimer’s Disease*.2010.

Kunkler, P.; Kraig R.. “Reactive astrocytosis from excitotoxic injury in hippocampal organ culture parallels that seen in vivo.” *J Cereb Blood Flow Metab*. 1997. **17**: 26–43.

Laemmli, U. K. “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4”, *Nature* 1970 **227**: 680-685.

Lazzari, M.; Franceschin, V. “Glial Fibrillary acidic protein and vimentin immunoreactivity of astroglial cells in the central nervous system of adult *Podarcis sicula* (Squamata, Lacertidae)”. *J. Anat*. 2001 .**198**:67-75.

Lee, AT; Cerami, A. “Nonenzymatic glycosylation of DNA by reducing sugars.” *Prog Clin Biol Res* 1989.**304**:291–299.

Lee-Kwon, W.; Park, D.; Baskar, P.V.; Kole, S.; Bernier, M... “Antiapoptotic signaling by the insulin receptor in Chinese hamster ovary cells.” *Biochemistry*.1998. **37**:15747–15757.

Li, J.; Schmidt; A. “Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products. ”*J Biol Chem*. 1997.**272**:16498-16506.

Li, Z.; Zhang, W. Sima, A. “C-peptide enhances insulin-mediated cell growth and protection against high glucose-induced apoptosis in SH-SY5Y cells.”*Diabetes Metab. Res. Rev*. 2003. **19**:375– 385.

Li, G.; Zhang, W.; Sima, A.. “The role of impaired insulin/IGF action in primary diabetic encephalopathy”. *Brain Research*. 2005. 1037:12-24.

Liedtke, W.; Edelman, W.; Bieri, P.; Chiu, F.; Cowan, N.; Kucherlapati, R., *et al*. “GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination.” *Neuron*.1996.17: 607–15.

Liu, L.; Hong, H.; Liao, J.; Wang, T.; Wu, J.; Chen, S.; Li, Y.; Long, Y.; Xia, Y.. “Upregulation of RAGE at the blood-brain barrier in streptozotocin-induced diabetic mice.” *Synapse*. 2009. **63**(8):636-42.

Lue, L.; Walker, D.; Jacobson, S.; Sabbagh, M.. “Receptor for advanced glycation end products: its role in Alzheimer's disease and other neurological diseases.” *Future Neurol*. 2009.**4**(2):167-177.

Ma, Q.; Yang, F.; Rosário, E.; Ubeda, O.; Beech, W.; Gant, D.; Chen, P.; Hudspeth, B.; Chen, C.; Zhao, Y.; Vinters, H.; Frautschy, S.; Cole, G.. “Beta-amyloid oligomers induce phosphorylation of tau and inactivation of insulin receptor substrate via c-Jun N-terminal kinase signaling: suppression by omega-3 fatty acids and curcumin.” *J Neurosci*. 2009. **29**(28):9078-89.

McCall, Al.. “Cerebral glucose metabolism in diabetes mellitus,” *European Journal of Pharmacology*.2004. **490**: 147–158.

McCall ; M., Gregg, R.; Behringer, R.; Brenner, M.; Delaney, C.; Galbreath, E.; Zhang, C.; Pearce, R.; Chiu, S.; Messing, A.. “Targeted deletion in astrocyte intermediate filament (GFAP) alters neuronal physiology.” *Proc Natl Acad Sci USA* 1996.**93**:6361–6366.

Meerwaldt, R.; Links, T.; Zeebregts, C.; Tio, R.; Hillebrands, J.; Smit, A.. “The clinical relevance of assessing advanced glycation endproducts accumulation in diabetes”. *Cardiovascular Diabetology*.2008.**7**:29.

Michaelidis, T.; Sendtner, M.;Cooper, J.; Airaksinen, M.; Holtmann, B.; Meyer, M.; Thoenen, H.. “ Inactivation of bcl-2 results in progressive degeneration of motoneurons, sympathetic and sensory neurons during early postnatal development.”*Neuron*.1996. 17: 75–89.

Miguel-Hidalgo, J.. “The Role of Glial Cells in Drug Abuse.” *Curr Drug Abuse Rev*.2009. **2**(1): 76–82.

Milligan, E.; Watkins, L.. “Pathological and protective roles of glia in chronic pain.” *Nat Rev Neurosci*. 2009. **10**(1): 23–36.

Monnier, M.. “Nonenzymatic glycosylation, the Maillard reaction and the aging process.” *J Gerontol*. 1990. **45**:105-111.

Morcos, M.; Sayed, A.; Bierhaus, A.; Yard, B.; Waldherr, R.; Merz, W.; Kloeting, I.; Schleicher, E.; Mentz,S.; Abd el Baki,R.; Tritschler, H.; Kasper, M.; Schwenger, V.; Hamann, A.; Dugi, K.; Schmidt, A.; Stern, D.; Ziegler, R.; Haering, H.; Andrassy, M.; van der Woude, F.; Nawroth,P.. “Activation of tubular epithelial cells in diabetic nephropathy.” *Diabetes*. 2002. **51**: 3532– 3544.

Moult , P.; Harvey, J.. “Hormonal regulation of hippocampal dendritic morphology and synaptic plasticity.” *Cell Adhesion & Migration*.2008. **2**:269-275.

Mohamed, A.; Bierhaus, A.;S. Schiekofer, S.;H. Tritschler,H.; R. Ziegler, R.;P.P. Nawroth, P..”The role of oxidative stress and NF-kappaB activation in late diabetic complications.”*Biofactors*.1999.**10**:157– 167.

Nitta, A.; Murai, R.; Suzuki, N.; Ito, H.; Nomoto, H.; Katoh, G.; Furukawa, Y.; Furukawa, S.. “Diabetic neuropathies in brain are induced by deficiency of BDNF.” *Neurotoxicol Teratol*.2002. **24**:695–701.

Nishikawa, T.; Edelstein, D.; Du, X.; Yamagishi, S.; Matsumura, T.; Kaneda, Y.; Yorek, M.; Beebe, D.; Oates, P.; Hammes, H.; Giardino, I.; Brownlee, M.. “Nishikawa, T. *et al*. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage.” *Nature*.2000. **404**:787–790.

Noda, M.; Nakanishi, H.; Nabekura, J., Akaike, N.. “AMPA-kainate subtypes of glutamate receptor in rat cerebral microglia.” *J Neurosci* .2000. **20**(1):251–258.

Obrosova, I.; Huysen, C.; Fathallah, L.; Cao, X.; Greene, D.; Stevens, M.. “ An aldose reductase inhibitor reverses early diabetes-induced changes in peripheral nerve function, metabolism, and antioxidative defense.” *FASEB J.*2002. **16**, 123–125.

Pasquier, F.; Boulogne, A.; Leys, D.; Fontaine, P.. “Diabetes mellitus and dementia”.*Diabetes metabolism.*2006. **32**:403-414.

Perea, G.; Araque A.. “Communication between astrocytes and neurons: a complex language.” *J Physiol Paris.* 2002. **96**(3–4):199–207.

Pekny, M.; Nilsson, M.. “Astrocyte activation and reactive gliosis.” *Glia.*2005. **50**(4):427-34.

Petros, A.; Olejniczak, E.; Fesik, S.. “Structural biology of the Bcl-2 family of proteins.” *Biochimica et Biophysica Acta.*2004. **1644**:83– 94.

Pfriefer, F.; Barres, B.. “Synaptic efficacy enhanced by glial cells in vitro.” *Science.* 1997. **277**:1684–1687.

Porte, D.; Kahn, J.. “beta-cell dysfunction and failure in type 2 diabetes: potential mechanisms”. *American diabetes association.*2001. **50**:160-163.

Powers, AC.. “Diabetes mellitus.” In: Fauci AS, Kasper DL, Longo DL, Braunwald E, Hauser SL, Jameson JL et al., editors. Harrison’s principles of internal medicine. 17th ed. United States of America: McGraw Hill Companies, Medical Publishing Division; 2008. p. 2275-2304.

Rees, D.; Alcolado, J.. “Animal models of diabetes mellitus.” *Diabet Med.* 2005. **22**(4):359-70.

Rizk, N.; Rafols, J.; Dunbar, J.. “Cerebral ischemia-induced apoptosis and necrosis in normal and diabetic rats: effects of insulin and C-peptide.”*Brain Res.* 2006. **1096**:204–212.

Ristow, M.. “Neurodegenerative disorders associated with diabetes mellitus”. *Journal of Molecular Medicine.*2004. **82**:510-529.

Roglic, G.; Unwin, N.; Bennett, PH.; Mathers, C.; Tuomilehto, J.; Nag, S.. “The burden of mortality attributable to diabetes: realistic estimates for the year 2000.” *Diabetes care* 2005. **28**:2130-2135.

Russell, J.; Berent-Spillson, A.; Vincent, A.; Freimann, C.; Sullivan, K.; Feldma, E.. “Oxidative Injury and Neuropathy in Diabetes and Impaired Glucose Tolerance.” *Neurobiol Dis.* 2008. **30**(3): 420–429.

Saad, M.; Araki, E.; Miralpeix, M.; Rothenberg, P.; White, M.; Kahn, C.. “Regulation of insulin receptor substrate-1 in liver and muscle of animal models of insulin resistance.” *J Clin Invest.* 1992. **90**:1839 –1849.

Sarthy, V.. “Focus on Molecules: Glial fibrillary acidic protein (GFAP).” *Experimental Eye Research*. 2007.**84**:381-382.

Schmidt, A.; Stern, D.. “RAGE: a new target for the prevention and treatment of the vascular and inflammatory complications of diabetes.”*Trends Endocrinol Metab*. 2000.**11**:368–375.

Schmidt, A.; Yan, S.; Yan, S.; Stern, D..“The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses.” *J. Clin. Invest*.2001.**108**:949–955.

Sima, A.. “New insights into the metabolic and molecular basis for diabetic neuropathy.” *Cell. Mol. Life Sci*.2003. **60**:2445–2464.

Sima, A. A. “Diabetic neuropathy in type 1 and type 2 diabetes and the effects of C-peptide”, *J Neurol Sci* 2004 **220**: 133-136.

Smith, P.; Krohn, R.; Hermanson, G.; Mallia, A.; Gartner, F.; Provenzano, M.; Fujimoto, E.; Goeke, N.; Olson, B.; Klenk, D.. “Measurement of protein using bicinchoninic acid.” *Analytical Biochemistry*.1985. **150**(1): 76-85.

Smith, S.; Gawronska-Kozak, B.; Janderová, L.; Nguyen, T.; Murrell, A.; Stephens, J.; Mynatt, R.. “Agouti expression in human adipose tissue: functional consequences and increased expression in type 2 diabetes.” *Diabetes*. 2003. **12**:2914-22.

Söllner, T.; Whiteheart, S.;Brunner, M.; Erdjument-Bromage, H.; Geromanos, S.; Tempst, P.; Rothman, J.. “SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion.” *Nature*.1993.**362**:318–324.

Sugimoto, K.; Murakawa, Y.; Sima, A.. “Diabetic neuropathy - a continuing enigma”. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*.2000. **16** (6): 408 – 433.

Sun, X.; Wang, L.; Zhang, Y.;Yenush, L.;Myers, M.; Glasheen, E.; Lane, W.; Pierce, J.; White, M.. “Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling.” *Nature*. 1995. **377**:173–177.

Takano, T.; Oberheim, N.; Cotrina, M.; Nedergaard, M.. “Astrocytes and ischemic injury.” *Stroke*. 2009. 40:8-12.

Tanti, J. F., Gual, P., Gremeaux, T., Gonzalez, T., Barres, R., and Le Marchand-Brustel, Y. “Alteration in insulin action: role of IRS-1 serine phosphorylation in the retroregulation of insulin signalling”, *Ann Endocrinol* 2004. **65**: 43-48.

Thomson, A. “Molecular frequency filters at central synapses.”*Prog Neurobiol*. 2000. **62**:159–196.

Thornall, P.. “Cell activation by glycated proteins. AGE receptors, receptor recognition factors, and functional classification of AGEs.” *Cell.Mol. Biol*. 1998. **44**:1013– 1023.

Tomlinson, D. ; Gardiner, N.. “Diabetic neuropathies: components of etiology”. *Journal of the Peripheral Nervous System*. 2008. **13**:112–121.

Toth, C.; Martinez, J.; Zochodne, D.. “ RAGE, Diabetes and Nervous System”. *Current Molecular Medicine*.2007.**7**:1-11.

Toth, C.; Schmidt, A.; Tuor, U.; et al.. “Diabetes, leukoencephalopathy and rage,” *Neurobiology of Disease*.2006. **23**:445–461.

Ulrich, P.; Cerami, A. “Protein glycation, diabetes, and aging.”*Recent Prog Horm Res*. 2001. 56:1–21.

Vallejo, R.; Tilley, D.; Vogel, L.; Ramsin Benjamin, R.. “The Role of Glia and the Immune System in the Development and Maintenance of Neuropathic Pain.” *Pain Practice*. 2010. **10**(3):167 – 184.

van der Heide, L.; Ramakers, G.; Smidt, M.. “Insulin signaling in the central nervous system: Learning to survive”. *Progress in Neurobiology*.2006. **79**(4): 205-221.

Vincent, A.; Perrone, L.; Sullivan, K.; Backus, C.; Sastry, A.; Lastoskie, C.; Feldman, E.. “Receptor for Advanced Glycation End Products Activation Injures Primary Sensory Neurons via Oxidative Stress.” *Endocrinology*. 2007.**148**(2):548–558.

Wajchenberg, B.“ β -Cell Failure in Diabetes and Preservation by Clinical Treatment.” *Endocrine Reviews*. 2007. **28**(2):187–218.

Wang, R.; Zhang, H., Tang, X.. “Huperzine A attenuates cognitive dysfunction and neuronal degeneration caused by beta-amyloid protein-(1-40) in rat.” *Eur J Pharmacol*. 2001.**421**(3):149-56.

Wautier, J.; Guillausseau, P..“ Advanced Glycation End Products, their Receptors and diabetic Angiopathy.” *Diabetes Metab*.2001. **27**:535-542.

White, M.. “IRS proteins and the common path to diabetes.” *Am J Physiol Endocrinol Metab*.2002. **283**(3):E413-22.

Wei M.; Zong W.; Cheng E.; Lindsten, T.; Panoutsakopoulou, V.; Ross, A.; Roth K.; MacGregor, G.; Thompson, C.; Korsmeyer, S.. “Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death.” *Science*. 2001. 292(5517):727-30.

Winocur, G.; Greenwood, C.; Pirolli, G.; Grillo, C.; Reznikov, L.; Reagan, L.; Reznikov, L.; Reagan L., McEwen, B.. “Memory impairment in obese zucker rats: An investigation of cognitive function in an animal model of insulin resistance and obesity.” *Behavioral Neuroscience*.2005. **119**:1389–1395.

Wild, S.; Roglic, G.; Green, A.; Sicree, R.; King H. “Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030.” *Diabetes Care*.2004. **27**(5):1047-1053.

Young, C.; Arima, K.; Xie, J.; Hu, L.; Beach, T.; Falkai, P.; Honer, W.G.. “SNAP-25 deficit and hippocampal connectivity in schizophrenia.” *Cereb. Cortex* .1998.**8**:261–268.

